

乳業用乳酸菌から“食べるワクチン”を！-新世代経口ワクチン・アジュバントの開発-

著者	北澤 春樹
URL	http://hdl.handle.net/10097/41462



乳業用乳酸菌から“食べるワクチン”を！

—新世代経口ワクチン・アジュバントの開発—

(研究課題番号 13556018)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））

研究成果報告書

平成16年 3月

研究代表者 北 澤 春 樹

(東北大学大学院農学研究科・助教授)

目 次

	ページ
【1】研究組織と研究経費	1
【2】研究発表	2
1) 学会誌等	
2) 口頭発表	
3) 総 説	
4) 記 事	
5) 特 許	
【3】研究成果	
1) 研究目的	6
2) 研究実施計画	13
3) 研究成績	15
4) ま と め	88
5) 参考論文	91
【4】研究成果公表論文等	
1) 学会誌等	102
2) 学会発表・招待講演	149
3) 総 説	169
4) 記 事	177
5) 特 許	180

【1】研究組織と研究経費

[研究組織]

研究代表者：北澤春樹（東北大学大学院農学研究科・助教授）

研究分担者：齋藤忠夫（東北大学大学院農学研究科・教授）

研究分担者：川井泰（東北大学大学院農学研究科・助手）

[研究経費]

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	6,500	0	6,500
平成14年度	4,700	0	4,700
平成15年度	2,600	0	2,600
総計	13,800	0	13,800

【2】研究発表

1) 学会誌等

1. 北澤春樹, 齋藤忠夫; 「乳酸菌からの免疫活性 DNA モチーフの発見と“生体防御食品”への応用。」ミニレビュー. わが国における乳酸菌のフロンティア研究. 日本農芸化学会誌, 76, 833-836 (2002).

2. Takeshi Shimosato, **Haruki Kitazawa**, Shinichiro Katoh, Yoshihisa Tomioka, Risuke Karima, Satoshi Ueha, Yasushi Kawai, Takanori Hishinuma, Kouji Matsushima and Tadao Saito; Swine Toll-like receptor 9 recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1627, 56-61 (2003).

3. **Haruki Kitazawa**, Hiroshi Watanabe, Takeshi Shimosato, Yasushi Kawai, Takatoshi Itoh and Tadao Saito; Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 11-21 (2003).

4. Takeshi Shimosato, **Haruki Kitazawa**, Masanori Tohno, Shinichiro Katoh, Yasushi Kawai, Tadao Saito; Development of immune assay system for both CpG and non-CpG DNA from lactic acid bacteria using a transfectant of swine Toll-like receptor 9. *Animal Science Journal*. in press.

5. Takeshi Shimosato, Masanori Tohno, **Haruki Kitazawa**, Shinichiro Katoh, Kouichi Watanabe, Yasushi Kawai, Hisashi Aso, Takahiro Yamaguchi and Tadao Saito; Toll-like receptor 9 expresses on M cells of follicle-associated epithelia in swine Peyer's patches. *Cell&Tissue Research*., submitted

6. Shinichiro Katoh, **Haruki Kitazawa**, Takeshi Shimosato, Masanori Tohno, Yasushi Kawai and Tadao Saito; Cloning and characterization of swine Interleukin-17 preferentially expressed in intestine. *J. Interferon Cytokine Res.*, submitted.

2) 口 頭 発 表

[学会発表]

1. **北澤春樹**, 下里剛士, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

乳酸菌 DNA モチーフの腸管パイエル板細胞による取り込みとサイトカインネットワークの制御

日本畜産学会 第 100 回大会 講演要旨集, p.177, 2002.

2. 下里剛士, **北澤春樹**, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

ブタ Toll-like receptor 9 (sTLR9)の腸管パイエル板からのクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2002 年度大会 講演要旨集, p.280, 2002. (学会トピックスに採択)

3. **北澤春樹**, 加藤真一郎, 下里剛士, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

乳酸菌遺伝子データバンクを用いた CpG DNA モチーフの検索と同モチーフを含む合成オリゴ DNA の免疫活性

日本畜産学会 第 101 回大会 講演要旨集, p.163, 2003.

4. 下里剛士, **北澤春樹**, 川井 泰, 齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor (sTLR) 9 発現細胞系の構築とその利用

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.69, 2003.

5. **北澤春樹**, 下里剛士, 川井 泰, 齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor (sTLR) 9 による乳酸菌 DNA モチーフの認識性

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.69, 2003.

6.遠野雅徳、北澤春樹、下里剛士、加藤真一郎、川井 泰、渡邊康一、山口高弘、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(TLR)9 の抗体作製と臓器発現部位の解析

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.70, 2003.

7.加藤真一郎、北澤春樹、下里剛士、川井 泰、齋藤忠夫

乳酸菌 DNA モチーフによるブタ腸管におけるサイトカイン mRNA の発現誘導

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.70, 2003.

8.下里剛士、北澤春樹、松本真由美、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(sTLR)2 のクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2003 年度大会 講演要旨集, p.11, 2003.

9.北澤春樹、下里剛士、松本真由美、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(sTLR)2 に相互作用をもつ sTLR1 および 6 のクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2003 年度大会 講演要旨集, p11, 2003

10.下里剛士、北澤春樹、遠野雅徳、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ TLR9 トランスフェクタントによる乳酸菌 DNA の免疫評価系の構築

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004.

(優秀発表賞受賞)

11.遠野雅徳、北澤春樹、下里剛士、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ TLR2 トランスフェクタントの構築とその利用

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004.

12.加藤真一郎、北澤春樹、下里剛士、遠野雅徳、川井 泰、齋藤忠夫

ブタインターロイキン-17(IL-17)のクローニングとその特徴
日本畜産学会 第103回大会 講演要旨集, p., 2004.

13.北澤春樹, 加藤真一郎, 下里剛士, 遠野雅徳, 川井 泰, 齋藤忠夫
ブタインターフェロン- γ 受容体(IFN γ R)のクローニングとその解析
日本畜産学会 第103回大会 講演要旨集, p., 2004.

[招待講演]

1.北澤春樹, 齋藤忠夫; 乳酸菌における免疫活性化 DNA モチーフの発見,
日本農芸化学会 2002 年度大会 シンポジウム SY-15.
わが国における乳酸菌のフロンティア研究, 講演要旨集, p.442, 2002.

2.北澤春樹, 齋藤忠夫; 乳酸菌の免疫活性 DNA モチーフ,
消化器プロバイオティクスシンポジウム'03, 日本プロバイオティクス学会,
講演要旨集, p.3, 2003.

3) 総 説

北澤春樹, 齋藤忠夫

「乳酸菌からの免疫活性 DNA モチーフの発見とブタ Toll 様受容体トランスフェクタントによる活性評価系の構築」特集 プロバイオティクスの機能と広がる応用範囲, 食品工業, 46(14), 25-31 (2003).

4) 記 事

「東北大, ブタの TLR 単離, ヒトモデルとしての免疫活性化因子スクリーニングに活用」基礎科学・技術・シーズ, 日経バイオテク(2003 年 4 月 14 日発行), p.28, 2003.

5) 特 許

1. Toll様レセプター強制発現細胞の利用 特許出願中(特願2003-172132)

【3】研 究 成 果

1) 研 究 目 的

生体の免疫システムは、先天的な自然免疫(*innate immunity*)と後天的に生じる獲得免疫(*acquired immunity*)に分類される[1]。ヒトなどの高等生物にしか存在しない獲得免疫に対し、自然免疫は昆虫からヒトまで幅広く保存されている生体防御システムである。適度な温度、栄養素があるにもかかわらず、我々の体が腐敗しない理由は病原体を察知して排除する免疫機構が存在するからである。昆虫、植物などすべての多細胞生物において感染症は脅威であり、それに対応すべくそれぞれの生物は感染防御機構を備えている。ヒトやマウスを中心としたこれまでの免疫学は主にリンパ球を中心とする獲得免疫の解析に集中していた。これまでの免疫学の解釈でリンパ球を持たない昆虫や血液細胞もない植物における感染防御機構を理解することは困難であった。感染防御機構の誘導は病原体の認識に始まり、宿主と病原体の認識はすべての感染防御機構において必要とされている。最近になって植物やハエにおける病原体認識分子が遺伝学的解析において明らかにされつつあり、トマトにおける病原体認識分子として、CF-9, CF-2 など[2-4]、またショウジョウバエにおける病原体認識分子として Toll が報告されている[5]。これらの分子はトマトやハエにおいて真菌を認識し、感染防御反応を誘導する分子として注目されている。病原体認識に関わるドメインがロイシンリッチリピート(LRRs)で構築されている点でこれらの分子は共通する点が多いと考えられている。

自然免疫は、好中球や樹状細胞、マクロファージを中心とする免疫機構で、限られた数の受容体で病原体に特異的な分子パターンを感知し、認識することにより生体防御を司っており、サイトカインなどの警戒信号を発して獲得免疫を活性化するなど感染防御の第一線として機能している[6]。一方、獲得免疫は T 細胞や B 細胞などリンパ球による抗原受容体遺伝子の再構成をすること

で多様な抗原を認識する病原体特異的な免疫反応誘導機構である[7]。自然免疫においては、獲得免疫のような特異的な病原体認識機構は存在しないが、病原体構成成分を認識し、宿主と識別する自己非自己の認識機構は存在するものと考えられていたが、このことはショウジョウバエの Toll 分子の発見まで長年の間謎とされてきた。

ショウジョウバエの Toll はもともと個体発生の過程で背腹軸決定に関わる分子として 1988 年に同定され[8]，その後 1996 年に Toll が真菌を察知するセンサーであり Toll シグナルによって抗菌ペプチドを中心とした感染防御反応が誘導されることが明らかとなった[5]。さらに Toll はヒトにまで幅広く保存されていることが判明し[9]，最近になって哺乳類 Toll 様分子，Toll-like receptor (TLR)が発見され，TLR がまさに病原体のセンサーであることが明らかとなったことで，長い間，謎とされてきた自然免疫における病原体認識機構が解明されようとしている。

TLR は細胞外にロイシンリッチリピート (LRRs)，細胞内にインターロイキン 1 受容体と相同性のある領域(TIR ドメイン)を持ち，現在までに 10 種類の TLR の存在が報告されている[9-14]。TLR ファミリーはそれぞれ認識分子すなわち細菌性モデュリンが異なると考えられている。細菌性モデュリンとは，細菌に特異的な分子パターン (pathogen associated molecular patterns; PAMPs) で，宿主に対しサイトカイン誘導能を示し，免疫応答を制御するものと定義されている。TLR ファミリーの認識分子として，TLR2 はペプチドグリカン(PGN)や細菌リポプロテイン(リポペプチド)(BLP)，リポアラビノマンナン(LAM)，および酵母細胞壁多糖チモサンを認識し[15-17]，TLR3 はウイルス由来二本鎖 RNA[18]，TLR4 は細胞壁多糖であるリポポリサッカライド (LPS) [19,20]，TLR5 は細菌鞭毛タンパクであるフラジェリン[21]，TLR7 は病原体の構成成分ではないが自然免疫系の活性化作用を持ち，ウイルス感染

症の治療薬として応用されている合成化合物、イミダゾキノリンの認識に関与することが明らかにされている [22,23]. また, TLR1, TLR6 は TLR2 と会合することでマイコプラズマのリポタンパク質のリピド構造の些細な相違を認識し[24,25], また TLR9 は細菌に特異的な CpG モチーフを持つ非メチル化 DNA を認識することが報告されている[26].

TLR は菌体成分を認識すると細胞内シグナル伝達系を活性化し, 共通のアダプター分子 MyD88 を介して IL-1 receptor associated kinase (IRAK), TNF receptor associated factor 6 (TRAF6), そして転写因子である NF- κ B の核移行を促し, 最終的に tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin(IL)-6, IL-12, IL-18 といった様々な炎症性サイトカインの産生や, 細胞表面共刺激因子 (co-stimulatory molecule) の発現が誘導する[27].

TLR ファミリーを介するシグナル伝達経路の例外として, TLR4 のリガンド分子である LPS の刺激により, MyD88 遺伝子ノックアウトマウス由来の樹状細胞は補助機能分子 CD40 を発現し T 細胞活性化能を増強させることが知られている[28]. すなわち LPS 刺激においては MyD88 非依存性経路の存在が明らかとなっており, サイトカイン産生は誘導しないが, 樹状細胞の成熟分化は誘導することが分かっている. また, LPS で刺激した野生型マウス由来樹状細胞が, Th1 細胞分化支持能を有することとは対照的に MyD88 遺伝子ノックアウトマウス由来 MyD88 樹状細胞は, Th2 細胞分化支持能を有し, そのことは *in vivo* においても, Th2 優位の免疫応答が認められている[29,30]. つまり MyD88 を介したシグナル伝達は, Th1 応答の成立に必須であること, さらに, TLR4 シグナルによる MyD88 非依存性経路は, Th2 応答を惹起しうることを示すものである.

TLR は細胞外 LRRs を持つレセプター型のタンパクであり, 細胞外 LRR の違いによってショウジョウバエの Toll と 18W は真菌と細菌, また哺乳類 TLR2

と TLR4 はグラム陽性菌とグラム陰性菌というようにそれぞれ異なる病原体を的確に認識、識別する。しかし、ショウジョウバエの Toll は真菌を認識するが、その認識は真菌由来の物質が Toll に直接結合するのではなく、Spaetzle と呼ばれる内因性のリガンドが、真菌によって活性化され、Toll に結合するものと考えられている[31]。しかしながら、真菌がどのようにして Toll のリガンドを活性化するのかについて、その詳細は明らかになっておらず、現在のところ、TLR を刺激する糖脂質や核酸と TLR との直接結合はまだ証明されていない。またその認識機構についても分子レベルでの理解には至っていない。LRRs の糖脂質や核酸との直接結合の分子レベルでの解析は現在まで報告されておらず、今後の課題となっている。

TLR は主に病原体の糖質、脂質や核酸を認識することから、タンパクを認識する獲得免疫と相補的であるといえる。また、TLR の病原体認識は単独ではなく、他の分子を必要とすることが最近明らかになりつつある。例えば LPS の認識は TLR4 だけでなく、TLR4 の細胞外ドメインに会合するアクセサリートンパク、MD-2 が必要であり、TLR4 を単独で細胞株に発現させても LPS シグナルは伝達されず、TLR4/MD-2 複合体を形成して初めて LPS が認識されることが報告されている[32]。また、TLR2 が認識するときには、TLR6 とダイマーを形成する事が必要であり、また、TLR2 および 4 の抗原認識は CD14 依存的であるという報告もある[33]。他の TLR や分子についても、その相互作用に関する研究は大変興味深く、現在盛んに行われている。

外来性微生物の存在をいち早く探知することは、生体防御において非常に重要である。哺乳類における自然免疫系の細胞(樹状細胞やマクロファージ)は、これら菌体構成成分を認識することで外来性微生物の存在をいち早く探知し炎症反応を励起する。特に CpG DNA は Th1 反応(自然免疫系を活性化する機構)を強く励起し、臨床面での応用が期待されている分子であり、その受容体

の解明が待たれていた。2000 年になって審良ら(大阪大学微生物病研究所癌抑制遺伝子研究分野)によって、強い免疫賦活化作用を有する CpG DNA の受容体として TLR9 が同定され、微生物由来 DNA の認識に必須の受容体分子であることが TLR9 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により初めて明らかとなった[26]。野生型マウスの脾臓細胞は LPS や CpG DNA に反応して増殖するが TLR9 遺伝子ノックアウトマウス由来の脾臓細胞は LPS に対しては野生型マウスと同程度の増殖を示すのに対し、CpG DNA に対する増殖能が著しく阻害されていた。また、野生型マウス腹腔より回収したマクロファージは、LPS や PGN, CpG DNA を認識し、活性化された抗原提示細胞は IL-6, IL-12, TNF- α などの炎症性サイトカインを産生すると同時に、CD40 などの補助機能分子の発現を増強した。補助機能分子の発現は、抗原提示と協同して、獲得免疫を担当する T 細胞の増殖を誘導し、また、IL-12 は、ナイーブ T 細胞を Interferon(IFN)- γ を産生する 1 型ヘルパー T(Th1)細胞へと分化誘導し、細胞性免疫を確立させる[34]。

一方、TLR9 遺伝子ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージは、LPS や PGN の刺激により正常マウス由来マクロファージと同様に TNF α を産生するが、CpG DNA の刺激では TNF α や IL-6, IL-12 の産生は認められなかった。さらに、野生型マウスの骨髄由来未熟樹状細胞は、LPS や CpG DNA の刺激により成熟し共刺激分子の発現が増強し IL-12 などのサイトカインを産生するが、TLR9 遺伝子ノックアウトマウス由来の未熟樹状細胞は、LPS による成熟や IL-12 の産生は野生型マウス同様に認められたものの、CpG DNA ではこれらの反応は認められなかった。さらに、*in vivo* における反応を調べるために野生型マウスおよび TLR9 遺伝子ノックアウトマウスに CpG DNA および D-ガラクトサミンを腹腔内に投与し、CpG DNA によるショックの誘導を行った。野生型マウスでは、投与後 1 2 時間以内にすべてのマウスが死亡したが、TLR9

遺伝子ノックアウトマウスは全匹5日以上生存していた。そのときの血中サイトカインの濃度測定の結果から、野生型マウスでは投与後1時間後に $\text{TNF } \alpha$ の濃度が上昇し、3時間後には IL-12 や IL-6 の濃度も上昇したが、TLR9 遺伝子ノックアウトマウスでは、これらサイトカインの上昇は認められなかった。CpG DNA は Th1 反応を強く誘導することが知られていることから、マウスに卵白アルブミン (OVA) 及び CpG DNA を投与し1週間後に膝下リンパ節を回収して OVA で刺激し、Th1 反応活性化の指標の一つであるインターフェロン (IFN)- γ の産生を測定した。その結果、野生型マウスでは OVA に反応して IFN- γ の産生が認められたが、TLR9 遺伝子ノックアウトマウスでは認められなかった。このように TLR9 が *in vivo* においても CpG DNA の認識に必須であることが明らかとなった[26]。

CpG DNA による免疫賦活化作用がクローズアップされ臨床応用が期待されている中で、これまでその分子メカニズムの詳細は分かっていなかったが、TLR9 遺伝子ノックアウトマウスの解析により TLR9 が CpG DNA の認識に必須であることが明らかになった。また、TLR を介したシグナル伝達は、獲得免疫を量的、質的、双方の面から制御していることになり、TLR シグナルを解析するには、抗原提示細胞、特に樹状細胞を用いた解析が極めて重要である。今後、TLR9 を介したシグナル伝達経路についてその認識メカニズムを分子レベルで明らかにすることにより、自然免疫という基本的な免疫システムがより解明されていくものと期待されている。また、細菌由来の DNA は免疫反応を特に促進することが知られており、この DNA を用いたワクチンの開発は、感染を抑制するだけの低い免疫応答から、細菌を殺す有効性の高い応答へと切り換えることができるため、結核などの感染症の治療、さらには癌、アレルギーなどへの幅広い応用が期待されている[35-38]。

当研究室ではこれまでに食品の有する生体調節機能、特に生体恒常性の維

持・調節に関わる機能に注目し、乳業用乳酸菌や乳酸菌由来因子(細胞壁, 菌体外多糖, ゲノム DNA および DNA モチーフ)の生物活性, とくに免疫賦活化作用について精力的に追究している[39-48]. また, ヒトモデル系として臓器移植の分野においてもその活用が大いに期待されているブタを対象として, 食品として利用される乳業用乳酸菌の腸管免疫活性化機構について追究している. 乳酸菌がもつこれらの免疫賦活化機能を検討し, それを機能性食品として応用する場合, 腸管免疫系における生物活性の評価系を構築することは大変有意義であり, また必要不可欠なことである. そこで本研究では, 乳酸菌の菌体成分を認識することが期待できる TLR に着目し, 免疫賦活化作用をもつ乳酸菌の腸内における認識機構と, その活性発現機構を解明することを目的とした. 本研究の成果は, 将来的に免疫増強作用を有する乳業用乳酸菌あるいはその成分, とくに乳酸菌由来機能性 DNA の生物活性評価系の構築を達成し, それら成分を利用した 21 世紀の未来食品「生体防御食品」の実現に大きく貢献するものと考えられる.

本研究では, 病原細菌由来非メチル化 CpG モチーフを有する CpG DNA を認識する TLR9 について, 腸管免疫系における作用機序を解明する目的で以下に示す内容に従い検討した.

- ① ブタ腸管パイエル板より精製した poly(A)⁺mRNA を用いて, ブタ TLR9 のクローニングおよび全構造遺伝子配列の決定と他動物種 TLR9 とのホモロジー解析を行なった.
- ② ブタ TLR9 について, 成熟ブタ, 初生仔ブタの各種臓器において Real-time quantitative PCR 法による mRNA レベルでの発現解析を行なった.
- ③ ブタ TLR9 特異的抗体を作成した.

- ④ ブタ TLR9 について，成熟ブタ，初生仔ブタの腸管組織においてウエスタンブロット法および免疫組織化学法（蛍光抗体染色法）によるタンパク質レベルでの発現解析を行なった．
- ⑤ ブタ TLR9 遺伝子を強制発現させた哺乳類細胞(トランスフェクタント)を構築した．

本研究は乳業用乳酸菌由来の DNA の腸管免疫に対する作用をサイトカイン誘導について発展的に解明することにより，21 世紀において疾病を予防する機能性 DNA モチーフを有する乳酸菌を用いた未来食品，“生体防御食品”の創製の基礎を築くものである．

2) 研究実施計画

本研究では，疾病予防機能性 DNA モチーフを有する乳酸菌を用いた未来食品，“生体防御食品”の創製の基礎を築くことを目的とし，乳業用乳酸菌由来の DNA の腸管免疫に対する作用を発展的に解明する．具体的な研究計画は以下のとおりである．

[平成13年度]

1. ブタ TLR9 のクローニングおよび全構造遺伝子配列の決定と発現解析
 - a) ブタ各種臓器由来 Poly(A)⁺mRNA の調製する．
 - b) ブタ TLR9 特異的 PCR プライマー，および定量的 PCR 用プライマーを設計する．
 - c) R T - P C R 法によるブタ TLR9 遺伝子のクローニングおよび遺伝子配列の決定する．

- d) ブタ各種臓器における TLR9mRNA 発現量を定量的 PCR 法により解析する.

[平成 14 年度]

2. ブタ TLR9 特異的抗体の作製と腸管組織におけるブタ TLR9 の発現解析

- a) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を作製する
- b) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による抗体価を測定する
- c) 免疫吸収試験による抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性を解析する
- d) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた, 腸管組織ウェスタンブロット解析をする
- e) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた腸管組織の免疫染色をする
- f) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた, 腸管組織フローサイトメトリー解析をする

[平成 15 年度]

3. ブタ TLR9 トランスフェクタントの構築

- a) 遺伝子導入プラスミドの調製する
- b) リポフェクション法によるブタ TLR9 遺伝子の哺乳類細胞へ導入する
- c) トランスフェクタントにおけるブタ TLR9 の発現解析をする
- d) ブタ TLR9 トランスフェクタントによる乳酸菌由来 DNA の取り込みについて解析する

3) 研 究 成 績

1. 材料および方法

1-1) 試薬

実験には特に断りのない限り, (株)和光純薬工業(Osaka, Japan)製の特級あるいは一級試薬を用いた. また水は全てミリ Q 水を用いた.

1-2) 実験動物

すべての実験にはフナコシ株式会社(Tokyo, Japan)より購入した親ブタ組織, およびヒルズ株式会社 (Miyagi, Japan) より購入した初生仔ブタを用いた.

1-3) ブタ組織 Poly(A)+mRNA の調製

ブタ組織をペニシリン(400mg/mL)・ストレプトマイシン(400U/mL)(Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) (SP) を含む PBS 中で洗浄し, 各種組織(心臓, 胸腺, 肺臓, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 骨格筋, 十二指腸, 回腸, 空腸, パイエル版, 腸管膜リンパ組織)を摘出した. 組織は 3mm 四方程度に細断し, 液体窒素中で凍結後, 使用まで-80℃で保存した. 凍結保存した組織は, 速やかに適当量の TRIzol Reagent(組織体積の 10 倍量以上, sample 50-100mg/mL TRIzol, Life Technologies)の入った丸底プロピレンチューブ (Falcon 2006, Becton Dickinson, Lincoln, NJ) に移し, Polytron (Kinematica AG, Switzerland)を用いよくホモジナイズした. 室温で 10min 放置した後, 破碎液を 1.5mL マイクロチューブに移し, TRIzol Reagent 1mL に対し 200 μ l クロロホルムを加え激しく攪拌し, 3min 放置した. 遠心分離後 (15,000rpm, 4℃, 15min), 上清部分の水層のみを新しい 1.5mL マイクロチ

ューブに回収し、回収量と同量のイソプロピルアルコールを加えよく攪拌し、室温で 10min 放置後、遠心分離(15,000rpm,4℃,15min)し、total RNA ペレットを得た。1 mL 冷 75%エタノール(RNase free)で洗浄後、エタノールを完全に風乾し、DEPC-H₂O に溶解し Total RNA 溶液を得た。Total RNA 溶液は TaKaRa OligotexTM-dT30 Super mRNA Purification Kit(TaKaRa, Kyoto, Japan)を用いて Poly(A)⁺mRNA のみを精製した。すなわち、マイクロチューブに付属の 2×Binding Buffer 50μl, OligotexTM-dT30 10μL および Total RNA 溶液 50μL を合わせ、70℃, 3min 加熱した後、室温で 10min 放置した。遠心分離後(15,000rpm, 4℃, 5min), 上清を除去し、付属の Wash Buffer 350μL で OligotexTM-dT30 を懸濁後、スピンカラムに移した。再び遠心分離し(15,000rpm, 4℃, 5min), この操作をもう一度繰り返した。カラム内の OligotexTM-dT30 は、70℃に保温した RNase free water 20-50μL により懸濁し、新しいマイクロチューブに遠心回収(15,000rpm, 4℃, 5min)した。

1-4) ブタ TLR9 特異的 PCR プライマーの設計

ヒト TLR9 (DDBJ/EMBL/GenBank, accession number; AB045180) , マウス TLR9 (DDBJ/EMBL/GenBank, accession number; AF348140) およびネコ TLR9 (DDBJ/EMBL/GenBank, accession number; AY137581) cDNA 構造遺伝子領域より、高度に保存されている領域を GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1(Software development,Tokyo)により解析し、ブタ TLR9 特異的プライマーを設計した。Oligo-DNA の化学合成は全て Sawady Technology Co. Ltd. (Tokyo, Japan)に依頼した。

1-5) cDNA の合成

1-3)で調製したブタ腸管パイエル板由来 Poly(A)⁺mRNA と 1-4)で設計したブタ TLR9 特異的 Reverse プライマーおよび 3'RACE Adapter primer を用いて, THERMO Script™ reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)による逆転写反応により cDNA を合成した.

1-6) cDNA の精製

cDNA の 精 製 は , QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN Co., Ltd.,Tokyo,Japan)を用いて行った. すなわち, PCR 産物の 5 倍量の BufferPB を混ぜ, QIAquick colum に加えた. 遠心後(13,000rpm, 4°C, 1min), 流出液を廃棄し, Buffer PE(wash buffer) 750μl をカラムに加え, 再び遠心(13,000rpm, 4°C, 1min)した. カラムを新しいマイクロチューブにセットし, 50μl の滅菌水をカラム中央の膜に加え, 1min 放置した後, 遠心(13,000rpm, 4°C, 1min)して精製 cDNA を得た.

1-7) ブタ TLR9 cDNA 断片のクローニング

1-4)にて設計したブタ TLR9 特異的プライマーと 1-6)で得られた cDNA を用い, 目的とするブタ TLR9 遺伝子断片を PCR 法, RACE 法により増幅した.

1-8)PCR 産物のアガロースゲル電気泳動

増幅した DNA フラグメントの電気泳動は 1.0-2.0%のアガロース濃度の泳動ゲルを用いて行った. 泳動緩衝液には 1×TBE 緩衝液(0.09M Tris-ホウ酸, 0.002MEDTA, pH8.0)を用いた. 分子量マーカーは, 1Kbp Stable ladder(SIGMA GENOSYS), 100bp Stable ladder (SIGMA GENOSYS)を用いた. 通電は 50V または 100V の定電圧下で行った. ゲルの染色はエチジウムブロマイド溶液(0.5μg/mL)に 15min 浸すことにより行った. 泳動装置は Mupid-

2(コスモ・バイオ, 東京)または水平型サブマリン電気泳動装置(Amersham pharmacia Biotech,UK)を用いた。フラグメントの検出は FAS-III (TOYOBO) を用いて行った。

1-9)アガロースゲルからの DNA の抽出

アガロースゲル電気泳動後, 目的の DNA 断片を UV 照射下で切り出し Quantum Prep™ Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns(Nippon Bio-Rad Laboratories K.K., Tokyo, Japan)により DNA を抽出した。すなわち角を切り落としたゲルを細断し, カラムに入れ, -20℃で 5min 急凍したあと, 室温で遠心(15,000rpm, 3min)し, DNA 溶液を回収した。

1-10) ライゲーションおよびトランスフォーメーション

アガロースゲルから回収した目的の DNA は pGEM-T Easy Vector System I (Promega,Co.,Madison,WI,USA)を用いてライゲーション反応を行なった。すなわち 0.5mL マイクロチューブに 2xRapid Ligation Buffer を 5 μ L, pGEM-T Easy vector(50ng)を 1 μ L, DNA 溶液を 3 μ L, T4 DNA Ligase を 1 μ L 加えよく混合し, 20℃, 1hr インキュベートした。ライゲーション済みプラスミド溶液 10 μ L は, 丸底のプロピレンチューブ (Falcon2006、Becton Dickinson、Lincoln、NJ) 中に 10xKCM 10 μ L, 30% PEG 7 μ L, ミリ Q 水 73 μ L とともによく混合した。氷中で穏やかに解凍した *E. coli* JM109 コンピテントセル (100 μ L) (Promega)を混合液に加え, チューブの底を緩やかに攪拌した。氷中で 20min 放置後, 室温で 10min 放置した。SOC 培地 (800 μ L) を加え 37℃で 1hour 振盪培養し, 表面に X-gal (TaKaTa) を塗布したアンピシリン (和光純薬工業(株)) 含 LB 平板培地に適当量を塗り広げた。37℃で一晩培養

し、ホワイトコロニーを形成したものをインサート陽性コロニーとした。

1-11) ダイレクト PCR 法によるクローニングベクターへのインサート挿入の確認

ホワイトコロニーにおけるブタ TLR9 cDNA 断片の検出はコロニーダイレクト PCR 法により行った。0.5mL マイクロチューブにミリ Q 水 4 μ l ずつ分注し、これにインサート陽性コロニーから滅菌楊枝を用いてかき取った菌体を懸濁した。PCR 反応溶液を調製し、菌体懸濁液に 16 μ l ずつ分注し(final 20 μ l)、良く混合した後 PCR を行った(反応溶液および反応条件は Table 2-2-7 に示した)。PCR 産物はアガロース電気泳動に供し、インサート確認した。また、接種した菌体は、同時に菌株保存用培地にも接種しておき、37℃、12hour 培養した。

1-12) インサート陽性プラスミドの調製

ブタ TLR9 cDNA 断片をインサートに持つプラスミドの調製は,Quantum Prep™ Plasmid Miniprep Kit(BIORAD)を用いた。すなわちダイレクト PCR によりブタ TLR9 cDNA 断片の存在を確認した菌株を菌株保存用培地上のコロニーから滅菌楊枝でかき取り、Terrific broth(TB)培地(3.0mL)に接種し、37℃で 16hour 振盪培養した。培養液は 1.5mL のマイクロチューブに移し、2 回に分けて遠心(15,000rpm, 4℃, 30sec)集菌し、200 μ l の Cell Resuspension Solution に再懸濁し、続いて 250 μ l の Cell Lysis Solution を加えてチューブを数回転倒混和して緩やかに懸濁した。250 μ l の Neutralization Solution を加え、同じく緩やかに転倒混和した後、遠心(12,000rpm, 4℃, 5min)した。上清を 2mL collection tube にセットしたスピンフィルターに移し、完全に懸濁した 200 μ l の Quantum Matrix を添加し、よくピペティングした後、

遠心 (14,000rpm, 4℃, 30sec) し, 流出液を廃棄した. 500 μ l の Wash Buffer にて 2 回遠心洗浄(14,000rpm, 4℃,30sec)したあと, 70℃に熱した滅菌水 50 μ l を加え, 遠心溶出(14,000rpm, 4℃, 1min)した.

1-13) DNA 配列決定

SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kits-LC(for 66-cm gels)(EPICENTRE TECHNOLOGIES, Madison, USA)を用いたサイクルシーケンシング反応により行った. すなわち, A,T,G,C と記した 0.5mL のマイクロチューブに Sequitherm EXCEL II-LC Termination Mix A,T,G,C をそれぞれ 2 μ l ずつ分注した. そこに Premix solution を 4 μ l ずつ分注し, Table2-2-8 に示した条件で反応させた. サイクル終了後, 各反応液に 3 μ l の Stop/Loading Buffer を加え, よく混合した. 95℃, 3min 加熱し, 氷上で急冷した後, 1.5 μ l を DNA シーケンサー Model 4000L (Li-cor,Lincoln,USA) にアプライした. データ解析は, Image Analysis Version 2.10 により行った.

1-14) DNA 配列決定

SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kits-LC(for 66-cm gels)(EPICENTRE TECHNOLOGIES, Madison, USA)を用いたサイクルシーケンシング反応により行った. すなわち, A,T,G,C と記した 0.5mL のマイクロチューブに Sequitherm EXCEL II-LC Termination Mix A,T,G,C をそれぞれ 2 μ l ずつ分注した. そこに Premix solution を 4 μ l ずつ分注し, Table2-2-8 に示した条件で反応させた. サイクル終了後, 各反応液に 3 μ l の Stop/Loading Buffer を加え, よく混合した. 95℃, 3min 加熱し, 氷上で急冷した後, 1.5 μ l を DNA シーケンサー Model 4000L (Li-cor,Lincoln,USA) にアプライした. データ解析は, Image Analysis Version 2.10 により行った.

1-15) 異種間における TLR9 遺伝子の相同性と系統樹解析

得られた cDNA 部分断片をつなぎ合わせて全長の構造遺伝子とし、GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1 を用いてヒト、マウスおよびネコ TLR9 遺伝子との間でヌクレオチドおよびアミノ酸配列について相同性解析を行なった。

1-16) ブタ TLR9 のタンパクドメイン解析

ブタ TLR9 アミノ酸配列は、SMART (<http://smart.EMBL-helidelberg.de>)[55][56]により解析し、シグナルペプチド、ロイシンリッチリピート、ロイシンリッチリピート C 末ドメイン、トランスメンブレン領域、Toll/interleukin-1 レセプターを特定した。また各々の領域について、ヒト、マウスとの相同性を解析した。

1-17) ブタ TLR9 ORF(open reading frame)のクローニング

ブタ TLR9 ORF は、Overlap PCR 法により得た。まず、THERMOSCRIPT™ Reverse Transcriptase(Invitrogen)を用いてストップコドンを含むプライマーから cDNA を合成した。ORF 中で 1 ヲ所のみ切断される制限酵素サイト(Nco I)を GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1 により検索し、その領域がオーバーラップするようにプライマーを作製し、2つの DNA 断片を増幅した。それら 2つの DNA 断片を制限酵素 Nco I (コスモバイオ)により切断し、電気泳動により必要な断片のみを分離、抽出した。これらの突出末端同士をライゲーションすることで ORF 断片を作成した。続いてこれをテンプレートに PCR を行ない、増幅した ORF を前述の方法によりクローニングした。オーバーラップした接続部位の配列確認は、1-14)の DNA シークエンスの方法に従って行った。

1-18) Real-time quantitative PCR 法による mRNA の定量

PCR 溶液調製には LightCycler-FastStart DNA Master SYBER Green I を使用した。分析機器として LightCycler(Roche Diagnostic, Tokyo, Japan)を用い、解析には LightCycler Software Ver.3.5 を用いた。

1-18-1) プライマー設計

ブタ TLR9 特異的プライマーは CG(シトシンとグアニン)の比較的高い領域である TIR domain より作製した。House keeping gene としてはブタ β -actin を採用し、M. Baarsch の報告した特異的プライマーを使用した[71]。

1-18-2) 最適 PCR 反応条件の検討

ブタ TLR9 のクローニングに用いたパイエル板由来 cDNA を template として 1-18-1)で設計したプライマーを用いて PCR 法により DNA フラグメントを増幅した。アガロース電気泳動に供した後、目的のバンドから DNA を抽出し、DNA 濃度を SmartSpec™3000 Spectrophotometer(BIO-RAD)により測定し、5pg/ μ L に調製した。この DNA を IPC(Internal Positive Control)配列として以降の PCR 反応における template にした。基本的な PCR 反応の最適化条件を設定するため、反応溶液中の MgCl₂ 含量を最終濃度 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM の 5 段階に分けて検討した。またプライマーダイマーのピークを抑えるため、プライマーのアニーリング温度およびアニーリング時間を検討した。同様に β -actin においても行った。

Buffer 組成および反応条件

Component of reaction mixture for PCR	(μ l)
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	2
template DNA	2
MgCl ₂ Stock solution, 25mM	1 mM; 0 2mM; 0.8 3mM; 1.6 4mM; 2.4 5mM; 3.2
Expression analysis Forward primer (10pmol/ml)	1
Expression analysis Reverse primer(10pmol/ml)	1
H ₂ O	up to 20

PCR Cycle		
a.	95°C	10min
b.	95°C	15sec
c.	60°C	10sec
d.	72°C	5sec
e.	4°C	soak

45 cycle

1-18-3) 標準曲線の作製

1-18-2)で合成した IPC 配列を template(negative control として template を含まないものも含める) として, PCR 反応溶液中の最終濃度 1.25pg/ μ L から 5 段階 1/10 ずつ段階希釈し, PCR 反応に供し, 得られた 5 段階の増幅曲線より, 指数関数的増幅領域での Ct (Threshold cycle) 値と蛍光強度から算

出した標準曲線(検量線)を作製した(Fit point 法). 同様に β -actin においても行った.

Buffer 組成および反応条件

Component of reaction mixture for PCR	(μ l)
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	2
MgCl ₂ Stock solution, 25mM	3mM; 1.6
template DNA;	2
Prepare a fresh dilution series of sTLR9 DNA fragment in water as follows;	
5pg/ μ l	
1:10=500fg/ μ l	
1:100=50fg/ μ l	
1:1000=5fg/ μ l	
1:10000=0.5fg/ μ l	
Expression analysis Forward primer (10pmol/ml)	1
Expression analysis Reverse primer (10pmol/ml)	1
<hr/>	
H ₂ O	up to 20

PCR Cycle

a.	95°C	10min	} 45 cycle
b.	95°C	15sec	
c.	60°C	10sec	
d.	72°C	5sec	
e.	4°C	soak	

1-19) 各種組織中のブタ TLR9 mRNA 発現量の比較

1-18-1)で設計したプライマー, 1-5)で合成した各種組織 cDNA, 1-18-2)で求めた最適 MgCl₂ 濃度および 1-18-3)で作製した検量線を用いて, Real-time quantitative PCR 法により各種組織におけるブタ TLR9 mRNA 発現量を比較した. すなわち設定した PCR 最適条件下のもとでの各種組織におけるブタ TLR9 遺伝子断片の増幅曲線を検量線に照らし合わせ, 得られたブタ TLR9 増幅 Index を同様にして得られたβ-actin 増幅 Index で割ることでブタ mRNA 発現 Index を算出し, 臓器間における発現量を比較した.

Buffer 組成および反応条件

Component of reaction mixture for PCR	(μl)
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I	2
MgCl ₂ Stock solution, 25mM	3mM; 1.6
template cDNA; derived from heart, thymus, lung, spleen, kidney, skeletal muscle, duodenum, jejunum, ileum, Peyer's patches and mesenteric lymph nodes	2
Expression analysis Forward primer (10pmol/ml)	1
Expression analysis Reverse primer(10pmol/ml)	1
<hr/>	
H ₂ O	up to 20

PCR Cycle

a.	95°C	10min	
b.	95°C	15sec	45 cycle
c.	60°C	10sec	
d.	72°C	5sec	
e.	4°C	soak	

1-20) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の作製

GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1(Software development,Tokyo)を用いてブタ TLR9 の全アミノ酸配列の中からエピトープ領域を検索した. またブタ TLR9 のタンパク質二次構造解析を行い, 抗体作製のための特異的なエピトープ部位を細胞外ドメインより探索した. ペプチド抗原の合成およびポリクローナル抗体の作製は Sawady Technology Co.,Ltd.(Tokyo,Japan)に依頼した.

1-21)Enzyme-linked immunosobant assay(ELISA)法による抗体価の測定

作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の抗体価を ELISA 法により測定した. すなわち固相化用バッファーにあらかじめ抗原ペプチドを最終濃度 5 μ g/mL で溶解させ, 抗原ペプチド溶液を調製した. この抗原ペプチド溶液を Immulon 2HB(Thermo Labsystems,Franklin,MA)の各ウェルに 100 μ l ずつ添加して固相化した (4 °C ,14h). PBS-T(0.05%Tween20 を含む phosphate-buffered saline)で洗浄(5min \times 3 回)後, ブロッキングバッファー(PBS with 1%BSA)を各ウェルに 150 μ l 添加してブロッキング(RT,2h)した. PBS-T で洗浄(5min \times 3 回)後, 一次抗体として 100~51,200 倍の希釈系列を作成した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体をそれぞれ各ウェルに 150 μ l ずつ添加して抗体反応(RT,2h)させた. MicroMixer E-36(TAITEC)を用いて

PBS-T で洗浄(5min×3 回)後、二次抗体として 1/1,000 に希釈した anti-rabbit IgG-peroxidase を各ウェルに 150 μ l 添加して抗体反応(RT,2h)させた。MicroMixer E-36(TAITEC)を用いて PBS-T で洗浄(5min×3 回)後、20ml の酵素基質用バッファーにあらかじめ OPD(o-phenylenediamine)を 30mg、発色操作直前に H₂O₂ を 7 μ l 加えて調製した発色溶液を直ちに各ウェルに 150 μ l 添加して発色反応させた。37℃で発色反応させた後、20% H₂SO₄を各ウェル 20 μ l 加えて反応停止させ、Multiscan MS-UV(Labsystems)で二波長測定(450/405nm)した。

1-22)組織免疫染色における抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の最適希釈倍率の検定

1-21)より得られた抗体価を参考にして、算出した希釈倍率から約 100 倍濃い濃度の希釈倍率を中心にした抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の希釈系列を作製した。この作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の希釈系列をそれぞれ一次抗体として組織免疫染色を行うことで、最適希釈倍率を検討した。

1-23) 免疫吸収試験による抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性の解析

1-23-1)ドットブロット分析による抗原ペプチドの検出限界量の決定

抗原ペプチド溶液の段階希釈系列を作製した後、BIO-DOT(Nippon BIO-RAD Laboratories K.K.,Tokyo,Japan)を用いて、自然ろ過モードにより PVDF 膜(Immobilon-P[®];Millipore Corporation,Bedford,MA)に 10 μ g~0.1ng の抗原ペプチドをドットブロッティングした。PVDF 膜を TBS-T(0.05%Tween20を含む tris-buffered saline,pH8.2)で洗浄(5min×1 回)後、ブロッキングバ

ッファー(TBS-T with 1% BSA, 1.5% Goat-serum: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) でブロッキング (RT, 30min) した。LABO SHAKER(BIO CRAFT)を用いて PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄(5min×1 回)後, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を抗体反応・希釈用バッファー(TBS-T with 0.1% BSA) に最適希釈倍率(1/1,000)で希釈し, 一次抗体として反応(RT, 30min)させた。PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄(5min×3 回)後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/1,000 に希釈した Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)を二次抗体として反応(RT, 30min)させた。PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄(5min×3 回)後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/300,000 に希釈した Alkaline phosphatase-streptavidin(SIGMA)を反応(RT, 30min)させた。PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄(3min×5 回)し, ECF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)を用いて反応(5min)後, Attophos(Ex; 440nm, Em; 560nm)を Molecular Imager Fx (Bio-Rad Lab., Hercules, CA)により検出することで, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の最適希釈倍率における抗原ペプチドの検出限界量をもとめた。

1-23-2) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体と抗原ペプチドを用いた免疫吸収試験

1-23-1)よりもとめた最適希釈倍率(1/1,000)における抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の抗原ペプチドの検出限界量を指標として, 50ng の抗原ペプチドと 1/100 に希釈した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体をスモールスケール(200 μ l)で抗原抗体反応(4 $^{\circ}$ C, 14h)させた。抗原抗体反応後, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の希釈倍率が 1/1,000 になるようにラージスケール(2ml)にし, 抗原抗体反応液を調製した。この抗原抗体反応液を一次抗体として組織免疫染色をおこない, 組織上における抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗

体の特異性を解析した。

1-24)エピトープ部位を含むリコンビナントタンパク質を用いた抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性の解析

1-24-1)プライマー設計

抗原ペプチドとして選択した aa;269-285(CPKDHPKLHSDTFSHLS)の領域をコードする cDNA を作製するために、GENETYX-SV/RC Ver. 11. 0. 3. 1 (Software development, Tokyo)により、特異的プライマーを設計した。なお、Forward primer には 5' 末端側に制限酵素 *Bam*H I の切断配列 (CGCGGATCC)を加え、Reverse primer には同じく 5' 末端側に制限酵素 *Hind* III の切断配列 (CCCAAGCTT)を付加した。

1-24-2)エピトープ部位をコードするブタ TLR9 cDNA 断片のクローニング

1-24-1)で設計した特異的プライマーとブタ TLR9 構造遺伝子を内部にもつプラスミドを用いて、目的とするブタ TLR9 遺伝子断片を polymerase chain reaction (PCR)法により増幅した。

Buffer 組成および反応条件

A)

	(μ l)
10 \times PCR Buffer	2
2.5mM dNTPmix	1.6
<i>TaKaRa</i> TM Taq Polymerase(5U/ml)	0.1
template;cDNA	0.1
Forward primer (20pmol/ μ l)	0.4
Reverse primer (20pmol/ μ l)	0.4
<hr/>	
Water	up to 20

B)

a.	95°C	5min	
b.	60°C	3min	
c.	72°C	60sec	
d.	95°C	30sec	30 cycle
e.	55°C	30sec	
f.	72°C	30sec	
g.	72°C	60sec	
h.	4°C	sork	

1-24-3) BL-21 コンピテントセルへのトランスフォーメーション

あらかじめ Lac I(Lac repressor protein)遺伝子をコードしたプラスミド;
pREP4 を導入しておいた BL-21-CodonPlus Competent Cells
(STRATAGENE)に、目的の cDNA 断片を導入した pQE-30 発現ベクターをト

ランスフォーメーションした。すなわち BL-21 コンピテントセルが 100 μ l 入った 0.5mL のマイクロチューブを氷上融解(10min)させた後、2-Mercaptoethanol を最終濃度 25mM になるように添加(0.175 μ l)し、約 20ng の plasmid DNA を加えた。氷上で放置(30min)した後、42℃の BLOCK INCUBATOR BI-525(ASTEL)で 60sec のヒートショックを与えた。ヒートショック後直ちに氷上に戻して放置(3min)した後、400 μ l の SOC 培地が入った丸底のプロピレンチューブ(Falcon 2006, Becton Dickinson, Lincoln, NJ)に添加して振盪培養(37℃, 1h)した。振盪培養後、アンピシリンおよびカナマイシン含 LB 平板培地に 20 μ l の培養液を塗布し、37℃, 16h 培養した。

1-24-4) リコンビナントタンパク質の発現誘導

1-24-3)後のアンピシリンおよびカナマイシン含 LB 平板培地から、シングルコロニーを滅菌楊枝でかき取り、1.0mL のアンピシリンおよびカナマイシン含 LB 液体培地に接種した。37℃で 16h の前培養後、クリーンベンチ内で培養液を 1.5mL のマイクロチューブに移し、そこから 950 μ l のアンピシリンおよびカナマイシン含 LB 液体培地の入った試験管に 50 μ l の培養液を接種した。1h の本培養後(OD_{600} =0.5-0.7), 100mM の IPTG(Isopropyl- β -thiogalactopyranoside)が最終濃度 1mM になるように培養液へ添加(10 μ l)し、37℃, 4h のタンパク質発現誘導をおこなった。誘導終了後、菌体を 1.5mL のマイクロチューブに移して遠心回収し、SDS サンプル Buffer で SDS 化(95℃, 10min)後、再び遠心し、上清をサンプルとして回収した。なお、発現確認のために、SDS-PAGE(分離ゲル濃度 14%)に供した後、PVDF 膜に転写したものを His-Tag 特異的 Ni-NTA(Nickel-nitrilotriacetic acid) conjugate を用いてウエスタンブロット法により解析した。

1-24-5) エピトープ部位を含む抗原ペプチドの電気泳動とウエスタンブロット解析

1-24-4)で得られた抗原ペプチドを含むサンプルを 125V 定電圧下の SDS-PAGE(分離ゲル濃度 14%)に供した後, SEMI-PHORE™ (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS) を用いて PVDF 膜 (Hybond™-P; amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し, Rapid CBB KANTO (KANTO CHEMICAL CO., INC) で染色 (10min) 後, 50% メタノールでバックグラウンドを脱色 (10min) した. PVDF 膜は, 100% メタノールで完全に脱色 (5min) し, TBS-T (0.05% Tween20 を含む tris-buffered saline, pH8.2) で洗浄 (5min × 1 回) 後, ブロッキングバッファー (TBS-T with 1% BSA, 1.5% Goat-serum; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) でブロッキング (4℃, 14h) した. LABO SHAKER (BIO CRAFT) を用いて PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min × 1 回) 後, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を抗体反応・希釈用バッファー (TBS-T with 0.1% BSA) で 1/100 に希釈し, 一次抗体として反応 (RT, 30min) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min × 3 回) 後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/1,000 に希釈した Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を二次抗体として反応 (RT, 30min) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min × 3 回) 後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/300,000 に希釈した Alkaline phosphatase-streptavidin (SIGMA) を反応 (室温, 30min) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (3min × 5 回) し, ECF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて反応 (5min) 後, Attophos (Ex; 440nm, Em; 560nm) を Molecular Imager Fx (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) により検出した.

1-25) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた免疫沈降

1-25-1) 組織由来の細胞抽出物の調製

PBSを入れた PETRI DISH(INA・OPTICA,Co.,Ltd)に二枚重ねのガーゼを敷き、その上で細断した成熟ブタの腸管膜リンパ節を押し潰しながら細胞を PBS 中に懸濁させ、細胞懸濁液を調整した。細胞懸濁液を PBS で 2 回遠心洗浄(5000rpm,4℃,5min)後、RIPA バッファー(1% NP-40,0.1% Sodium Deoxycholate,0.1% SDS,150mM NaCl,1mM EDTA,0.2mM Sodium orthovanadate,1% aprotinin を含む 10mM Tris-HCl,pH7.4)で細胞成分を溶解(4℃,14h)させ、Optima™ TL Ultracentrifuge(BECKMAN INSTRUMENTS, INC.,PALO ALTO,CA)を用いて超遠心分離(50,000rpm,4℃,20min)し、上清を回収した。回収した上清を透析膜(三光純薬株式会社)により脱塩(16h)後、凍結乾燥(14h)することにより細胞抽出物を調製した。

1-25-2) 免疫沈降

1.5mL マイクロチューブ内で、1-25-2)で得られた凍結乾燥物 1mg を 1ml の PBS に完全に溶解させた。この 1.5mL マイクロチューブに抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を 1/100 希釈になるように添加(10 μ l)し、抗体反応(4℃,2h)させた。さらに、anti-rabbit IgG(Whole molecule)-agarose(SIGMA)を 20 μ l 加え、抗体反応(4℃,2h)させた。抗体反応後、アガロース画分を遠心(14,000rpm,4℃,30sec)回収し、さらに VORTEX-GENIE 2(Scientific Industries)を用いて PBS でよく洗浄(3min \times 5 回)した。洗浄後、アガロース画分を SDS サンプルバッファーで SDS 化(95℃,10min)し、再び遠心した後、上清をサンプルとして回収した。

1-25-3) 免疫沈降産物の電気泳動とウエスタンブロット解析

1-25-2)で得られた抗原ペプチドを含むサンプルを 125V 定電圧下の SDS-

PAGE(分離ゲル濃度 8%)に供した後, SEMI-PHORT™ (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS) を用いて PVDF 膜 (Hybond™-P; amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し, Rapid CBB KANTO (KANTO CHEMICAL CO., INC) で染色 (10min) 後, 50%メタノールでバックグラウンドを脱色 (10min) した. PVDF 膜は, 100%メタノールで完全に脱色 (5min) し, TBS-T (0.05% Tween20 を含む tris-buffered saline, pH8.2) で洗浄 (5min×1 回) 後, ブロッキングバッファー (TBS-T with 1% BSA, 1.5% Goat-serum; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) でブロッキング (4℃, 14h) した. LABO SHAKER (BIO CRAFT) を用いて PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min×1 回) 後, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を抗体反応・希釈用バッファー (TBS-T with 0.1% BSA) で 1/100 に希釈し, 一次抗体として反応 (RT, 60min) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min×3 回) 後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/1,000 に希釈した Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を二次抗体として反応 (RT, 1h) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (5min×3 回) 後, 抗体反応・希釈用バッファーで 1/300,000 に希釈した Alkaline phosphatase-streptavidin (SIGMA) を反応 (RT, 30min) させた. PVDF 膜を TBS-T でよく洗浄 (3min×5 回) し, ECF (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて反応 (5min) 後, Attophos (Ex; 440nm, Em; 560nm) を Molecular Imager Fx (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) により検出した.

1-26) 組織の免疫染色

組織化学全般にわたって, 取り扱おうとする組織あるいは細胞は, 可能な限り変質の少ない状態で保存することが求められる. その過程が固定 (fixation) である. 固定がよい状態でなければ, その後の組織化学において良

い結果が期待できる。一方、固定が不良だと以降の操作にどんなに力を入れても良い結果は得られない。そこで、①目的とする抗原性の保持、②目的とする抗原の本来の部位への保持、③組織の形態の保持、の3点を達成するために、本実験においてはペプチド鎖の抗原の保持に優れているザンボニ液を固定液として選択し、固定後凍結切片を作製した。

1-26-1) ザンボニ液の調製

ザンボニ液はピクリン酸とパラホルムアルデヒドを含む中性緩衝固定液で、凍結、パラフィン用両方可能だが、通常は凍結切片用である[29]。ザンボニ液の調製法は以下の通りである。イオン交換水 100ml あたりピクリン酸 1.4g 以上をよく攪拌して溶解させ、一晩放置後、残渣が残っている状態にする。この飽和ピクリン酸溶液を FILTER PAPER(2,125mm)(ADVANTEC)を用いて濾過し、濾過した飽和ピクリン酸溶液 150ml を調整する(A 液)。一方、パラホルムアルデヒド 20g をイオン交換水 100ml に加え、加温・攪拌(60℃,20min)しながら 1N の水酸化ナトリウムを 4~5 滴添加して中和・冷却後、FILTER PAPER(2,125mm)(ADVANTEC)を用いて濾過したものを B 液とする。この A 液および B 液を全量混合し、0.1M リン酸緩衝液(phosphate buffer,PB,pH7.4)で 1L とし、ザンボニ液を調製した。このように調製したザンボニ液は室温で約 1 年間保存可能である。

1-26-2) ザンボニ液を用いた組織の固定

摘出した成熟ブタおよび初生仔ブタの各種臓器で、特に方向性を有する臓器(腎臓、骨格筋、十二指腸、回腸、回腸由来パイエル板、下垂体)に関しては、その方向性を考慮した上で、臓器の挫滅を避けながら鋭利な刃物(フェザー替刃)を用いて引き切りをし、5×5×2mm の組織片とした。一方、特に方

向性を有しない臓器(心臓, 胸腺, 肺臓, 脾臓, 肝臓, 腸管膜リンパ節, 膵臓, 甲状腺, 副腎)に関しても, 同様に $5 \times 5 \times 2\text{mm}$ の組織片を作製した. これら組織片を, ザンボニ液中で放置(4°C , 16h)させて完全に固定した.

1-26-3) 組織固定後の洗浄

固定後の洗浄は, 凍結切片作製時に形成する氷結晶を小さくするため, アラビアゴムおよびスクロースを加えた PBS で行った. すなわち, 固定終了後の組織片を 1% Arabic Gum/8% Sucrose in PBS で洗浄放置(4°C , 24h)後, さらに 1% Arabic Gum/16% Sucrose in PBS で洗浄放置(4°C , 24h)し, 固定液を完全に洗い流した.

1-26-4) 組織片の包埋

洗浄後, 凍結用包埋剤(TISSUE TEK OCT compound; Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo)を用いて急速凍結した. すなわち, アルミフォイルで作ったボートの中に, 包埋剤と試料を入れ, 直ちにドライアイス・アセトンで急速凍結した. 固定後凍結した組織片は, 凍結切片作製まで -80°C ディープフリーザーで保存した.

1-26-5) 凍結切片作製

固定後凍結した組織片から, 凍結切片作製機(クリオスタット; Leica)を用いて凍結切片を作製した. すなわち -80°C ディープフリーザーから固定後凍結した組織片を取り出し, 低温での薄切のためにクリオスタット内で放置(-20°C , 2h)した. 放置後, 凍結切片用のディスポーザブル替刃を用いて, $10\mu\text{m}$ 厚前後の凍結切片を作製し, PLL(Poly-L-Lysine)coated Micro Slide Glass(MATSUNAMI GLASS Ind., Ltd)に貼付けた. 切片貼付後のスライドグラ

スは、切片内の水分をすみやかに蒸発させるために風乾(30min)した。

1-26-6) 蛍光抗体法による組織免疫染色

作製した凍結切片を PBS-T(0.02% Tween20 を含む phosphate-buffered saline)で振漬洗浄(RT,2min)した後、切片をモイスチャーチャンバー内に移して、ブロッキングバッファー(TBS-T with 1% BSA,1.5% Goat-serum:Vector Laboratories,Inc.,Burlingame,CA)を切片にマウントすることでブロッキング(RT,20min)した。ブロッキング終了後、ブロッキングバッファーをデカントし、一次抗体として、1/1,000 に希釈した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を切片にマウントして抗体反応させた(RT,60min)。PBS-T で振漬洗浄(RT,2min×3 回)後、二次抗体として、1/1,000 に希釈した Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)(Molecular Probes,Inc.,Eugene)を切片にマウントして抗体反応(RT,30min)させた。PBS-T で振漬洗浄(RT,2min×3 回)後、200,000 倍希釈した SYTOX orange(Molecular Probes,Inc.,Eugene)を切片にマウントして核染色(RT,10min)した。PBS-T で振漬洗浄(RT,2min×3 回)後、更にミリ Q 水で洗浄し、PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium(IMMUNON)を用いてスライドガラスに封入後、共焦点レーザー顕微鏡(BIO-RAD)により解析した。

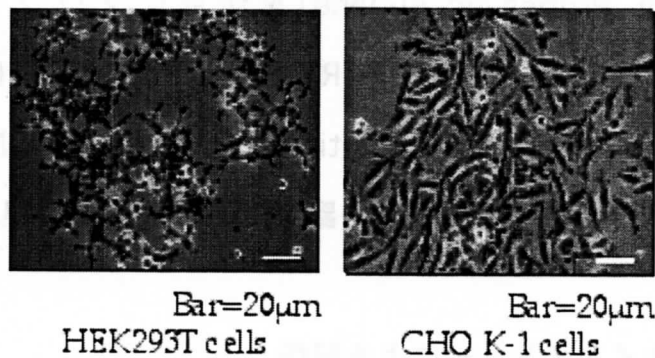
1-26) フローサイトメトリーによる解析

PBS を入れた PETRI DISH (INA・OPTICA,Co.,Ltd)に二枚重ねのガーゼを敷き、その上で細断した成熟ブタの各種臓器(十二指腸, 空腸, 回腸, 回腸由来パイエル板, 腸間膜リンパ節および脾臓)を押し潰しながら細胞を PBS 中に懸濁させ、細胞懸濁液を調整した。細胞懸濁液を PBS で 2 回遠心洗浄(1,500rpm,4℃,5min)後、細胞数をカウントし、 1×10^5 ずつ 96well dish

に播いた。PBS+10%FCS で 1 回遠心洗浄(1,000rpm,4℃,5min)後、一次抗体として 1/100 に希釈した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を各ウェル 20 μ l ずつ加えて懸濁し、抗体反応(4℃,60min)させた。PBS+10%FCS で 2 回遠心洗浄(1,000rpm,4℃,5min)後、二次抗体として、1/200 に希釈した Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)(Molecular Probes,Inc.,Eugene)を各ウェル 20 μ l ずつ加えて懸濁し、抗体反応(4℃,30min)させた。PBS+10%FCS で 3 回遠心洗浄(1,000rpm,4℃,5min)後、ナイロンメッシュを通しながらシースー液に懸濁し、FACSCalibur™(BECTON DICKINSON)で解析した。

1-27) 遺伝子導入細胞

ヒト胎児腎細胞(Human primary embryonal kidney cells; HEK293T)、およびチャイニーズハムスター卵巢細胞(Chinese hamster ovary cells; CHO K-1 細胞)は東北大学加齢医学研究所癌細胞保存施設(TKG)より譲受した。



1-28) 遺伝子発現ベクター (哺乳類細胞)

本実験において用いた pcDNA3 ベクター(5.4kb)(Invitrogen)はタンパク質高発現用 CMV (cytomegarovirus) プロモーターをもつ遺伝子発現ベクターである。

1-29) プライマー設計

pcDNA3 ベクターのマルチクローニングサイトにブタ TLR9 遺伝子を組み込むため、制限酵素サイトを付加したブタ TLR9 ORF 用のプライマーを設計した。ブタ TLR9 ORF 領域に切断部位を持たないような、pcDNA3 ベクターのマルチクローニングサイトの制限酵素サイトを検索した結果、*Hind*III と *Bam*HI を制限酵素として採用した。また、Forward プライマーにはブタ TLR9 のシグナルペプチド領域を除き、ブタ TLR9 の N 末側には KOZAK コンセンサス配列（開始コドンを含む）とそれに続く FLAG-Tag 配列を付加した。*Hind*III と *Bam*HI サイトはそれぞれ Forward と Reverse プライマーの 5'末端に付加した。

1-30) 遺伝子導入プラスミドの調製

1-30-1) PCR 法による pcDNA3 プラスミドに導入する DNA の増幅

ブタ TLR9 ORF を含む pGEM-T-Easy ベクターをテンプレートに 2-4) で設計したプライマーを用いて PCR を行い、制限酵素サイト、KOZAK コンセンサス配列、および FLAG-Tag 配列を付加したブタ TLR9 ORF DNA を増幅した。

Buffer 組成および反応条件

Component of reaction mixture for PCR	(μ l)
10 \times PCR Buffer	2
2.5mM dNTPmix	1.6
<i>TaKaRa</i> TM Ex-Taq Polymerase (5U/ml)	0.1
template plasmid(pGEM-T-Easy vector +Swine TLR9 (10ng/ μ l)	1
Forward primer(20pmol/ml)	0.4
Reverse primer(20pmol/ml)	0.4
H ₂ O	up to 20

PCR Cycle

a.	95°C	4min	} 40 cycle
b.	94°C	30sec	
c.	60°C	30sec	
d.	72°C	3min	
e.	72°C	7min	
f.	4°C	soak	

1-30-2) 制限酵素処理

1-24-1)で得られた PCR 産物および遺伝子発現ベクター-pcDNA3 を制限酵素 *Hind*III と *Bam*HI にて処理した.

Buffer 組成および反応条件

Component of reaction mixture for PCR		(μ l)
10 \times K Buffer		2
DNA; 1 μ g		10
<i>Hind</i> III (10U)		1
<i>Bam</i> H I (10U)		1
H ₂ O		up to 20

Reaction temperature;

37°C 20hour

70°C 15min

1-30-3) Ligation&Transformation&プラスミド抽出

1-24-2)より得られた制限酵素処理済み KOZAK コンセンサス配列, および FLAG-Tag 配列を付加したブタ TLR9 ORF DNA および pcDNA3 ベクターに Ligation および JM109 コンピテントセルにトランスフォーメーションし, プラスミドを抽出した.

1-30-4) 制限酵素処理によるインサートチェック

1-30-3)にて得られたプラスミド(pcDNA3-KOZAK-FLAG tag-ブタ TLR9)を再び制限酵素 *Hind* III と *Bam* H I で処理し, アガロース電気泳動に供し, 約 5.4kb と約 3.1kb のサイズにバンドが観られることを確認した.

1-31) 抗生物質 G418 二硫酸塩の最適濃度検定

6well Dish マルチプレートに G418 二硫酸塩を 0.5mg/mL, 0.8mg/mL,

1.0mg/mL, 1.2mg/mL, 1.5mg/mL, 2.0mg/mL に 10%FCS 添加 D-MEM で希釈した培地に懸濁した 2×10^4 個/well の コントロール細胞を播いた。その後 1 週間以内に全滅する最低濃度をトランスフェクタントのセレクション最適濃度とした。

1-32) Transfection(リポフェクション法)

一日目：HEK293T 細胞および CHO K-1 細胞を 3cm Dish に 4×10^5 個播き、37℃, 5%CO₂ 条件下で一晩培養した。

二日目：リポフェクタミン (Invitrogen)10 μ l を OPTI-MEM 培地 (Invitrogen)200 μ l に混合した溶液とブタ TLR9 遺伝子を導入した発現ベクター (pcDNA3+swine TLR9)1 μ g を溶解した OPTI-MEM 培地 (Invitrogen)200 μ l をよく混ぜ合わせエッペンに回収した (20-30min, 室温放置, この間に細胞の Dish を OPTI-MEM で 3 回洗う)。OPTI-MEM を 1.6mL 加え, total 2mL とし細胞の Dish に加えた (4h, 37℃, 5%CO₂)。D-MEM, 20%FCS を 2mL 添加し (Final 10%FCS) 一晩培養した。

三日目：リポフェクタミン添加後, 24 時間後に Dish を PBS で洗浄し, 3mL D-MEM, 10%FCS に置換した。

四日目：細胞を 10cmDish に播き直した。

六日目：セレクション用の抗生物質, G418 二硫酸塩を 1.0mg/mL 添加した。概ねセレクション開始から 3 日後くらいから G418 に耐性を持たない細胞, すなわちトランスフェクタント以外の細胞が死に始め, 残った細胞が 1×10^5 個くらいに増えた段階で cell sorting した (セレクション開始からおおよそ 1 週間後)。なお, 発現ベクター pcDNA3 のみを導入した細胞をコントロールとした。

1-33) セルソーティング

東京大学医学部分子予防医学研究室の cell sorting システム (BECKMANCOULTER 社 EPICS) を借用し、発現ベクター由来の FLAG-Tag を発現している細胞を positive cells として選抜し、回収した。

1-34) 導入細胞系におけるブタ TLR9 遺伝子発現解析

1-34-1) RT-PCR 法による発現解析

10^7 個のコントロール HEK293T 細胞 ($293T^{\text{control}}$), コントロール CHO K-1 細胞 ($CHO\ K-1^{\text{control}}$) およびブタ TLR9 遺伝子トランスフェクタント HEK293T 細胞 ($293T\ cells^{\text{sTLR9 trans}}$), トランスフェクタント CHO K-1 ($CHO\ K-1^{\text{sTLR9 trans}}$) より第三章 2-3) の方法により Total RNA を抽出し, Oligo-dT adapter primer を用いて cDNA を合成した. その cDNA を template として humanTLR9 特異的プライマー, humanGAPDH 特異的プライマーと swine TLR9 特異的プライマーを用いて, RT-PCR 法により発現解析を行った.

1-34-2) フローサイトメトリーによる解析

$293T^{\text{control}}$, および $293T^{\text{sTLR9 trans}}$ を 1×10^5 個ずつ 96well Dish に播き, PBS+5%FCS で 2 回遠心洗浄後, 1 次抗体として 100 倍希釈 Anti-FLAG M5 mouse IgG1 monoclonal antibody (SIGMA) および Anti-swine TLR9 rabbit IgG polyclonal antibody; $50\mu\text{L}$ に懸濁し, 4°C で 1hour 処理した. PBS+5%FCS で 2 回遠心洗浄後, 2 次抗体として 200 倍希釈の Anti-mouse IgG1-Per CP (日本ベクトンディッキンソン株式会社) と Anti-rabbit IgG1-Alexa 488 (Molecular probes); $50\mu\text{L}$ に懸濁し, 4°C で 30min 処理した. PBS で 3 回遠心洗浄後, ナイロンメッシュを通してシースー液に懸濁し, 解

析した。CHO K-1^{control} と CHO K-1^{sTLR9 trans} では一次抗体として Biotin conjugated-FLAG M2mouse IgG1 monoclonal antibody(SIGMA), 二次抗体として Streptavidin-PE を用いた。(Anti-swine TLR9 rabbit IgG polyclonal antibody を用いた場合は同様)

1-34-3) レーザー顕微鏡による解析

293T, CHO K-1^{control} および 293T^{sTLR9 trans}, CHO K-1^{sTLR9 trans} を 1×10^4 個ずつコラーゲン type I をコートした Disk に播き, 一晚培養(37°C, 5%CO₂) 後, -20°C 冷アセトンにて固定した(-20°C, 20min). アセトンをドライヤーで完全に乾燥し, 24 well Dish に移し, PBS で 5min, 2 回洗浄後, 0.1%BSA/PBS でブロッキングした(4°C, 60min). PBS で 5min, 2 回洗浄後, 一次抗体として 100 倍希釈の Anti-FLAG M2 biotin 抗体 100 μ L を添加し, 4°C, 60min 反応させた。次に, PBS で 5min, 2 回洗浄後, 2 次抗体として 200 倍希釈の Anti-mouse IgG1 streptavidin PE-Cy5 を添加し, 4°C, 30min 染色した。PBS で 5min, 3 回洗浄後, 200,000 倍希釈 SYTOX orange(Molecular Probes 社) で核染色(4°C, 10min)した。PBS で 5min, 3 回洗浄後, 更にミリ Q 水で洗浄し, PERMA FLUOR を用いてスライドガラスに封入した後, 共焦点レーザー顕微鏡(BIO-RAD)により解析した。

1-35) CpG oligo nucleotide(CpG ODN)配列

今まで報告されている CpG 研究により見出された CpG2006 (ヒト免疫細胞を強く活性化する), CpG1826 (マウス免疫細胞を強く活性化する), CpG1840 (ヒト免疫細胞の活性化が弱い), non CpG2041 (CpG 配列を持たない免疫細胞活性化能がない), また当研究室で見出している乳酸菌免疫賦活化 DNA, HuST (TCGT 配列(ヒト型 CpG 配列)を持つ *Streptococcus* 由

来 DNA) , HuLG (TCGT 配列(ヒト型 CpG 配列)を持つ *Lactobacillus gasseri* 由来 DNA) , HuLB (TCGT 配列を持つ *Lactobacillus bulgaricus* 由来 DNA) , MsST-1 (ACGT 配列(マウス型 CpG 配列)を持つ *Streptococcus* 由来 DNA) , OLLB-7 (ACGT 配列(マウス型 CpG 配列)を持つ *Lactobacillus bulgaricus* 由来 DNA) , AT5AC-L (AT および AC 配列を多く持つ *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T 由来 DNA) , TCGT-B40 (TCGT 配列(ヒト型 CpG 配列)を持つ *Lactobacillus bulgaricus* 由来 DNA) , Lipopolysaccharides(LPS)(negative control).

DNA motif name	Sequence
CpG 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
CpG 1826	TCCATGACGTTCCCTGACGTT
CpG 1840	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT
nonCpG 2041	CTGGTCCTTCTGGTTTTTTTCTGG
HuST	TATCGTCCTTGCAGATCGTA
HuLG	GAAAAGGCTGTCGTTTTAGA
HuLB	ACTCGATCGTCCTGGAAAAT
MsST-1	CAGGACGTTGTATCACTGAA
OLLB-7	CGGCACGCTCACGATTCTTG
ATAC-L	TATAATTTTTACCAACTAGC
TCGT-B40	AGCAGTCGTGGTCGTGTAGC

1-35) CpG ODN の取り込み解析

1-35-1) フローサイトメトリーによる解析

コントロール細胞およびトランスフェクタント細胞を 1×10^5 個ずつ 96well Dish に播き, PBS+5%FCS で 2 回遠心洗浄後, FITC-CpG ODN $5 \mu\text{M}$ および FITC-LPS $20 \mu\text{g/mL}$ の濃度で細胞に懸濁した(37°C , 1 hour). 5%FCS 添加 PBS

で3回遠心洗浄後100倍希釈 Biotin conjugated-Anti-FLAG M2 mouse IgG1 monoclonal antibody(50 μ L)を4 $^{\circ}$ Cで1hour 処理した。PBS+5%FCS で2回遠心洗浄後、2次抗体として200倍希釈の Streptavidin-PE (50 μ L) を4 $^{\circ}$ Cで30min 処理した。PBS で3回遠心洗浄後、ナイロンメッシュを通しながらシースー液に懸濁し、取り込み解析を行った。

1-35-2) レーザー顕微鏡による解析

コントロールおよびトランスフェクタントを 1×10^4 個ずつコラーゲン type I をコートした Disk に播き、一晚培養(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)後、PBS に懸濁した CpG DNA および LPS を Dish に添加した(37 $^{\circ}$ C, 1hour)。反応後-20 $^{\circ}$ C 冷アセトンで固定(-20 $^{\circ}$ C, 20min)し、Disk を完全に風乾した。24 well Dish に移し、PBS で5min, 2回洗浄後、0.1%BSA/PBS でブロッキングした(4 $^{\circ}$ C, 60min)。PBS で5min, 2回洗浄後、一次抗体として100倍希釈の Anti-FLAG M2 biotin 抗体 100 μ L を添加し4 $^{\circ}$ C, 60min 反応させた。PBS で5min, 2回洗浄後、2次抗体として200倍希釈の Anti-mouse IgG1 streptavidin PE-Cy5 を添加し、4 $^{\circ}$ C, 30min 染色した。PBS で5min, 3回洗浄後、200,000倍希釈 SYTOX orange(Molecular Probes 社)で核染色(4 $^{\circ}$ C, 10min)した。PBS で5min, 3回洗浄後、更にミリ Q 水で洗浄し、PERMA FLUOR を用いてスライドガラスに封入した後、共焦点レーザー顕微鏡(BIO-RAD)により解析した。

2. 結果

2-1) ブタ TLR9 特異的プライマーの設計

TLR9 は現在までに、ヒト、マウスおよびネコにおいてクローニングがなされており、その塩基配列およびアミノ酸配列が公開されている。GenBank/EMBL のデータベースよりこれらの配列を入手し、GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1 によりアライメント解析を行なった結果、両者とも比較的 C 末側、特に TIR ドメインにおける相同性が高かった。これらの領域で特に、ヒト、マウス間で相同性の高い部分よりプライマーを設計した。プライマーは GC 含量が 50%、アニーリング温度が 55℃～60℃になるような 20～30mer の塩基配列とした。

Primer sequences used in sTLR9 gene cloning

sTLR9 gene cloning primer	Forward primer	Reverse primer
sTLR9(2301-2775)	CAACCTGAAAGTCCTAGACG	GGCAGAAGTTCGGTTATAG
sTLR9(1708-2347)	AGCTACAACAGCCAGCCCTT	AGGCGCAGTGCAGAGGGTT
sTLR9(1057-1727)	CTGCGCAAGCTCAACCTGT	AAGGGCTGGCTGTTGTAGCT
sTLR9(140-1089)	CTGCCTTCCTACCCTGTGA	GTGGTAATTGAAGGACAGGTT
sTLR9(5'RACE, cDNA synthesized)		GCAGTTCCACTTGAGGTT GA
sTLR9(5'RACE, 1st nested PCR)	*5'RACE Abridged Anchor Primer	ACGAAGTCAGAGTCGTGCAA
sTLR9(5'RACE, 2nd nested PCR)	*Abridged Universal Amplification Primer	AGGAAGAGCCAGTTGCAGTT
sTLR9(3'RACE, cDNA synthesized)		*Oligo-d(T) ₁₇ Adaptor Primer
sTLR9(3'RACE, PCR)	GGGCACAGCCCTGACCAGGG	*Abridged Universal Amplification Primer
sTLR9(ORF cloning primer)	ATGGGGCCCCCGTGCACCCTGCACCC	CTATTCGGCTGTCGTGGGGCCCCCGGC

*5'RACE Abridged Anchor Primer, Abridged Universal Amplification Primer and Oligo-d(T)₁₇ Adaptor Primer were purchased from Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA.

2-2) ブタ TLR9 cDNA 塩基配列の決定

ブタ回腸由来パイエル板より抽出した mRNA をテンプレートとして各種プライマーにより RT-PCR を行い、得られたブタ TLR9 cDNA フラグメントを組み合わせることで、cDNA 全塩基配列を決定した。その結果、1,030 のアミノ酸残基(MW;115.9kDa)をコードする 3,093bp の ORF を含む 3,329b のブタ TLR9 cDNA 塩基配列を決定することができた

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
AGCGTCGGGGTGGTGGACCTGTCCCAACAAGCTGGACCTGTATACAGGGCGGCTGGTTC						
S L R V L D L S H N K L D L Y H G R S F						
1630	1640	1650	1660	1670	1680	
ACGGAGCTGCCGGCGCTGGAGGACATGGACCTCAGCTACACAGCCAGCCCTTACCATGT						
T E L P R L E A L D L S Y N S Q P F T M						
1690	1700	1710	1720	1730	1740	
CAGGGTGTGGGCGACAACCTCAGTTCTGTGGCCAGCTGCCCGCCTTGCGCTACCTCAGC						
Q G V G H N L S F V A Q L P A L R Y L S						
1750	1760	1770	1780	1790	1800	
CTGGCGCACAAATGACATCATAGCCGAGTGTCCCAAGAGCTCTGTAGCGCCTACATGTGC						
L A H N D I H S R V S Q Q L C S A S L C						
1810	1820	1830	1840	1850	1860	
GCCCTGGACTTTAGCGGCAACGATTCTGAGCCGGATGTGGCTGAGGGAGACCTCTATCTC						
A L D F S G N D L S R M W A E G D L Y L						
1870	1880	1890	1900	1910	1920	
CGCTTCTTCAAGGCTTAAGAAGCTAGTCTGGTGGACCTGTCCAGAACCTCAGCTGAC						
R F F Q G L R S L V W L D L S Q N H L H						
1930	1940	1950	1960	1970	1980	
ACCTCTCTGCCACGTGGCTTGGACAACCTCCCCAAAAGCCTGAAGCATCTGCATCTCCGT						
T L L P R A L D N L P K S L K H L H L R						
1990	2000	2010	2020	2030	2040	
GACAATAACCTGGCTTCTTCAAC TGGAGCAGCTGACCTCTCTGCCCAAGCTGGAAACC						
D N N L A F F N W S S L T L L P K L E T						
2050	2060	2070	2080	2090	2100	
CTGGACTTGGCTGGAAACCAGCTGAAGGCGCTTAAGCAATGGCAGCCTGCCATCTGGCACC						
L D L A G N Q L K A L S N G S L P S G T						
2110	2120	2130	2140	2150	2160	
CAGCTGGCGAGGCTGGACCTCAGTGGCAACAGCATCGCTTTGTGAACCTTGGCTTCTTT						
Q L R R L D L S G N S I G F V N P G F F						
2170	2180	2190	2200	2210	2220	
GCCCTGGCCAAGCAGTTAGAAGAGCTCAACCTCAGCGCCCAATGCCCTCAAGACAGTTGGAG						
A L A K Q L E E L N L S A N A L K T V E						
2230	2240	2250	2260	2270	2280	
CCCTCTGGTTTGGCTCGATGGTGGCAACCTGAAAGTCTCAGACGTGAGCGCCCAACCTT						
P S W F G S M V G N L K V L D V S A N P						
2290	2300	2310	2320	2330	2340	
CTGCATCGCCCTGTGGGCGACCTTCGTGGGCTCTCTGCTGGAGGTACAGGCTGCCCGTG						
L H C A C G A T F V G F L L E V Q A A V						
2350	2360	2370	2380	2390	2400	
CCTGGGCTGCCCAGCCGCGCTCAAGTGTGGCAGTCCGGGCGAGCTCCAGGGCCATAGCATC						
P G L P S R V K C G S P G Q L Q G H S I						
2410	2420	2430	2440	2450	2460	
TTTGGCAAGACCTCGGCCCTCTGCTGGATGAGACCTCTCTGTGGAACTGTTTGGCATC						
F A Q D L R L C L D E T L S W N C F G I						
2470	2480	2490	2500	2510	2520	
TCGCTGTGGCATGGCGCCCTGGGCTGGTTGTGGCCATGCTGCACCACTCTCTGGGCTGG						
S L L A M A L G L V V P M L H L C G W						
2530	2540	2550	2560	2570	2580	
GACCTCTGTGACTGCTTCCACCTGTGCTGGGCTGGCTGCCCAACGAGGCGACGGCGG						
D L W Y C F H L C L A W L P H R G Q R R						
2590	2600	2610	2620	2630	2640	
GGCGCAGAGCCCTGTTCTATGATGCCCTCGTGGCTTTTGACAAGCTCAGAGTCTGTGTG						
G A D A L F Y D A F V F V F D K A Q S A V						
2650	2660	2670	2680	2690	2700	
GCCGACTGGGTGTACAACGAGCTGCGGGGTGCAGCTGGAGGAGCGCCGTGGGCGCGCGCA						
A D W V Y N E L R V Q L E E R R G R R A						
2710	2720	2730	2740	2750	2760	
CTCGCCTGTGGCTGGAGGAGCGAGACTGGTTACCTGGCAAGCAGCTCTTCGAGAACCTG						
L R L C L E E R D W L P G K T L F E N L						
2770	2780	2790	2800	2810	2820	
TGGGCTCAGTGTACAGCAGCGCGAAGACCCGTGTTGTGCTGGCGCCACACGGACCGTGT						
W A S V Y S S R K T L F V L A H T D R V						
2830	2840	2850	2860	2870	2880	
AGCGGCTCTTGGCTGGCAGTTTCTGCTGGGCCAGCAGCGGCTGCTGGAGGACCGCAAG						
S G L L R A S F L L A Q Q R L L E D R K						
2890	2900	2910	2920	2930	2940	
GAGGTGTAGTGTGGTGATCTTGGCGCCGATG						

N F C R G P T T A E *

AA +182

swi.ne	1	MGP-RCT-LHPLSLVQVYALAAATLQAGRLPAFLPCELPQHLVNCNWLFLKSVPHFSAA	58	swi.ne	538	RSFTTELPRLAELDSLNSQPFMTQGVGHNSFVAQLPALRYLSLAHNDIHSRVSQQLCSA	597
human	1	MGP-CRSALHPLSLVQVYALAAATLQAGRLPAFLPCELPQHLVNCNWLFLKSVPHFSAA	59	human	539	HSFTTELPRLAELDSLNSQPFMTQGVGHNSFVAHLRLTLRHLSLAHNDIHSRVSQQLCST	598
mouse	1	MYLRRRT-LHPLSLVQVYALAAATLQAGRLPAFLPCELPQHLVNCNWLFLKSVPHFSAA	59	mouse	540	KSFSELPQLQALDLYNSQPFMSKQZGHNSFVAHLRLTLRHLSLAHNDIHSRVSHLSN	599
cat	1	MGP-CHGALHPLSLVQVYALAAATLQAGRLPAFLPCELPQHLVNCNWLFLKSVPHFSAA	59	cat	539	RSFTTELPRLAELDSLNSQPFMSQGVGHNSFVAQLPALRYLSLAHNDIHSRVSQQLCSA	598

swi.ne	59	APRANVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLSRLTLNKLKNCPPAGLSPMHFPCMTIEPTTF	118	swi.ne	598	SLCALDFSGNLSRMNAEGDLYLRFQGLRSLVNLDSLQNHILTLPRALDNLKSLKHL	657
human	60	APRGNVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLSRLTLNKLKNCPPAGLSPMHFPCMTIEPTTF	119	human	599	SLRALDFSGNALGHMNAEGDLYLHFFQGLSGLIWLDLSQNRHLTLPLQTLRLNPKSLQVL	658
mouse	60	ASCSNITLRLSLSNRIHHLHSDDFVHLSRLTLNKLKNCPPAGLSPLHFSCHMTIEPTTF	119	mouse	600	SVRFDFSGNGRMDDEGLYLHFFQGLSGLLKLDLSQNRHLTLPLQTLRLNPKSLKLL	659
cat	60	APRGNVTSLSLSNRIHHLHSDDFVHLSRLTLNKLKNCPPAGLSPMHFPCMTIEPTTF	119	cat	599	SLRALDFSGNALSRMNAEGDLYLXFFQGLRSLVNLDSLQNRHLTLPLRDLNPKSLRL	658

swi.ne	119	LAMPTLEELNLSYNSITTPALPDSVLSLSRNLTLVDPHTLGLHARLYLMDGNCY	178	swi.ne	658	HLRDNILAFNWSLTLPLKLETLDAQNLKALNGSLPSGTQLRRLDLSGNSIGFVNP	717
human	120	LAMPTLEELNLSYNSITTPALPDSVLSLSRNLTLVDPHTLGLHARLYLMDGNCY	179	human	659	RLRDNILAFNWSLTLPLKLETLDAQNLKALNGSLPSGTQLRRLDLSGNSIGFVNP	718
mouse	120	LAMPTLEELNLSYNSITTPALPDSVLSLSRNLTLVDPHTLGLHARLYLMDGNCY	179	mouse	660	SLRDNILAFNWSLTLPLKLETLDAQNLKALNGSLPSGTQLRRLDLSGNSIGFVNP	719
cat	120	LAMPTLEELNLSYNSITTPALPDSVLSLSRNLTLVDPHTLGLHARLYLMDGNCY	179	cat	659	RLRDNILAFNWSLTLPLKLETLDAQNLKALNGSLPSGTQLRRLDLSGNSIGFVNP	718

swi.ne	179	YKPCQAGLEVMPGALGLGLNLTHLSLKYNNILTEVPSPPLSETLLSYNHIVLTPED	238	swi.ne	718	GFFALAKLEELNLSANALKTVEPSWFGSGMGLKVDVSAIPHCACGAATFVGLLEQ	777
human	180	YKPCQAGLEVMPGALGLGLNLTHLSLKYNNILTEVPSPPLSETLLSYNHIVLTPED	239	human	719	GFFSKAKLEELNLSANALKTVEPSWFGSGMGLKVDVSAIPHCACGAATFVGLLEQ	778
mouse	180	YKPCQAGLEVMPGALGLGLNLTHLSLKYNNILTEVPSPPLSETLLSYNHIVLTPED	239	mouse	720	AFALAVELKEVNLSHNLKTVDSWFGSGMGLKVDVSAIPHCACGAATFVGLLEQ	779
cat	180	YKPCQAGLEVMPGALGLGLNLTHLSLKYNNILTEVPSPPLSETLLSYNHIVLTPED	239	cat	719	SFFALATRLRLNLSANALKTVEPSWFGSGMGLKVDVSAIPHCACGAATFVGLLEQ	778

swi.ne	239	LANLTALRVLDVGGNCRCDHAPNCPCECPKPKHLSPTFSLHLEGLVKDSSLNHL	298	swi.ne	778	AAVPGLPSPKCGSPQQLQGSIFAQDLRLCLDETLNINFCISLLAMALGLVPMHLHL	837
human	240	LANLTALRVLDVGGNCRCDHAPNCPCECPKPKHLSPTFSLHLEGLVKDSSLNHL	299	human	779	AAVPGLPSPKCGSPQQLQGSIFAQDLRLCLDETLNINFCISLLAMALGLVPMHLHL	838
mouse	240	LANLTALRVLDVGGNCRCDHAPNCPCECPKPKHLSPTFSLHLEGLVKDSSLNHL	299	mouse	780	TKVPGLANGVKGSPQQLQGSIFAQDLRLCLDETLNINFCISLLAMALGLVPMHLHL	839
cat	240	LANLTALRVLDVGGNCRCDHAPNCPCECPKPKHLSPTFSLHLEGLVKDSSLNHL	299	cat	779	AAVPGLPSPKCGSPQQLQGSIFAQDLRLCLDETLNINFCISLLAMALGLVPMHLHL	838

swi.ne	299	DARWRLGLDRQLVLDSENFYDICTKTTAFQGLARLRNLNLSFYHKKVSAFHLHAPS	358	swi.ne	838	CGNDLWYCFHLCLAWLPHKGRRRGAD--ALFYDAFVDFKQASAVADWYNELRVLEER	895
human	300	NASWRLGLDRQLVLDSENFYDICTKTTAFQGLARLRNLNLSFYHKKVSAFHLHAPS	359	human	839	CGNDLWYCFHLCLAWLPHKGRRRGADALFYDAFVDFKQASAVADWYNELRVLEER	898
mouse	300	NSWRLGLDRQLVLDSENFYDICTKTTAFQGLARLRNLNLSFYHKKVSAFHLHAPS	359	mouse	840	CGNDLWYCFHLCLAWLPLARSRRSQAQ-LPYDAFVDFKQASAVADWYNELRVLEER	898
cat	300	NPRWRLGLDRQLVLDSENFYDICTKTTAFQGLARLRNLNLSFYHKKVSAFHLHAPS	359	cat	839	CGNDLWYCFHLCLAWLPHKGRRRGAD--ALFYDAFVDFKQASAVADWYNELRVLEER	896

swi.ne	359	FGLHLSKLEDMGIFFRSLSETTLQPLVQLPQLTLQNNFINQAQLSIFGAFGLRY	418	swi.ne	896	RGRRALRLCLEERDNLPGKTLFENLWASVYSRKTFLVLAHTDRVSGLLRASFLLAQRL	955
human	360	FGSLVALKLEDMGIFFRSLSETTLQPLVQLPQLTLQNNFINQAQLSIFGAFGLRY	419	human	899	RGRMALRLCLEERDNLPGKTLFENLWASVYSRKTFLVLAHTDRVSGLLRASFLLAQRL	958
mouse	360	FKHLVSLQLEDMGIFFRSLSETTLQPLVQLPQLTLQNNFINQAQLSIFGAFGLRY	419	mouse	899	RGRRALRLCLEERDNLPGKTLFENLWASVYSRKTFLVLAHTDRVSGLLRTSFLLAQRL	958
cat	360	FGSLVSLQLEDMGIFFRSLSETTLQPLVQLPQLTLQNNFINQAQLSIFGAFGLRY	419	cat	897	RGRRALRLCLEERDNLPGKTLFENLWASVYSRKTFLVLAHTDRVSGLLRASFLLAQRL	956

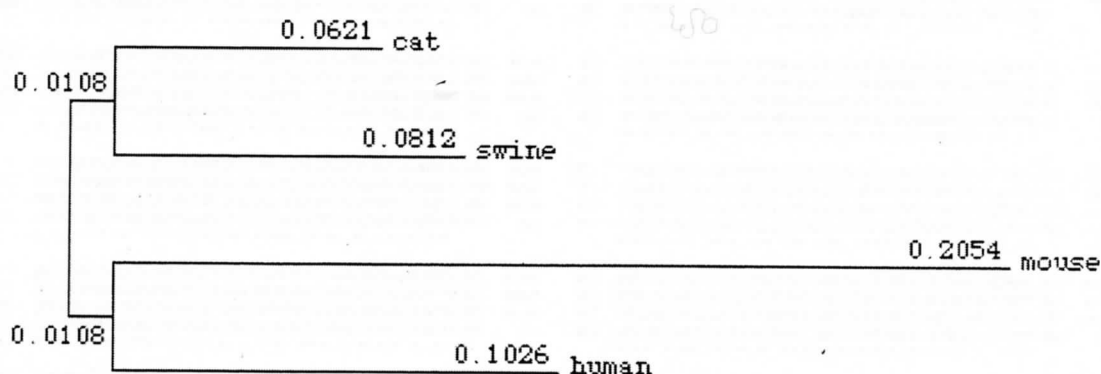
swi.ne	419	VOLSDNRISGAARPVATREVDGR-ERWLPSPRLAPPLDLTSLSEDFAFNCKAFSTLD	478	swi.ne	956	LEDKDVVLVILRPDAHRSRYVRLRQLCRQSVLWPHQPSGQGSFWAQLGTALTRDNR	1015
human	420	VOLSDNRISGAARPVATREVDGR-ERWLPSPRLAPPLDLTSLSEDFAFNCKAFSTLD	478	human	959	LEDKDVVLVILSPDGRSRYVRLRQLCRQSVLWPHQPSGQGSFWAQLGTALTRDNR	1018
mouse	420	VOLSDNRISGASLSEATPEEADAEQELLSADPAPPLSPAPKSNFDRCKNFKFTMD	479	mouse	959	LEDKDVVLVILRPDAHRSRYVRLRQLCRQSVLWPHQPSGQGSFWAQLGTALTRDNR	1018
cat	420	VOLSDNRISGASLSEATPEEADAEQELLSADPAPPLSPAPKSNFDRCKNFKFTMD	478	cat	957	LEDKDVVLVILRPDAHRSRYVRLRQLCRQSVLWPHQPSGQGSFWAQLGTALTRDNR	1015

swi.ne	478	LSRNNLVTIQEMFARLSRLCQLSLSHNISQAWNGSQFPLTLQVLDLSHKLIDLYHG	537	swi.ne	1016	HFYNNRCRGPITAE	1030
human	479	LSRNNLVTIQEMFARLSRLCQLSLSHNISQAWNGSQFPLTLQVLDLSHKLIDLYHG	538	human	1019	HFYNNRCRGP-TAE	1032
mouse	480	LSRNNLVTIQEMFARLSRLCQLSLSHNISQAWNGSQFPLTLQVLDLSHKLIDLYHG	539	mouse	1019	HFYNNRCRGP-TAE	1032
cat	479	LSRNNLVTIQEMFARLSRLCQLSLSHNISQAWNGSQFPLTLQVLDLSHKLIDLYHG	538	cat	1017	HFYNNRCRGPITAE	1031

2-3) ブタ TLR9 と他種 TLR9 遺伝子との相同性および系統樹解析

ブタ TLR9 cDNA ヌクレオチド配列は ORF 領域においてヒト TLR9 と 84.8%, マウスとは 78.1%, ネコにおいては 86.7%の相同性を示した。またアミノ酸配列においてはヒト TLR9 と 81.8%, マウスとは 74.9%, ネコにおいては 86.7%の相同性を示し、マウスに比べヒトやネコに対して高い相同性を示した。

NJ method



Homology of swine TLR9 to various species in the nucleotide and the amino acid sequences

Species	Nucleotide sequence homology(%)	Amino acid sequence homology(%)
human	84.8	81.8
mouse	78.1	74.9
cat	86.7	86.7

2-4) 「SMART」による sTLR9 タンパク構造解析

アミノ酸配列において、シグナルペプチド、ロイシンリッチリピート、トランスメンブレン領域および Toll/interleukin-1 レセプタードメインをタンパクドメイン解析ソフト「SMART」により解析した。ブタ TLR9 の、ヒト、マウスおよびネコに対する各部位のアミノ酸ホモロジーは、シグナルペプチド (SP)(aa;1-25)で 71.4%, 76.2%, 69.2%, ロイシンリッチリピート (LRRs)(aa; 62-771)で 79.2%, 70.8%, 85.1%, トランスメンブレン(TM)(aa; 818-835)で 78.9%, 73.7%, 78.9%, Toll/interleukin-1 レセプタードメイン(aa; 866-1013)で 91.9%, 90.6%, 96.0%であった(Table 2-3-2). この結果は、C 末端に近い部分ほど相同性が高いことが特徴的で、特に、トラ

ンスメンブレンを境に細胞質側の Toll/interleukin-1 レセプタードメイン領域については極めて高いホモロジーを示した。



Homology of swine TLR9 to various species in protein domain

Species	SP(%)	LRRs(%)	TM(%)	TIR(%)
human	71.4	79.2	78.9	91.9
mouse	76.2	70.8	73.7	90.6
cat	69.2	85.1	78.9	96.0

2-10) Real-time PCR 用プライマーの設計

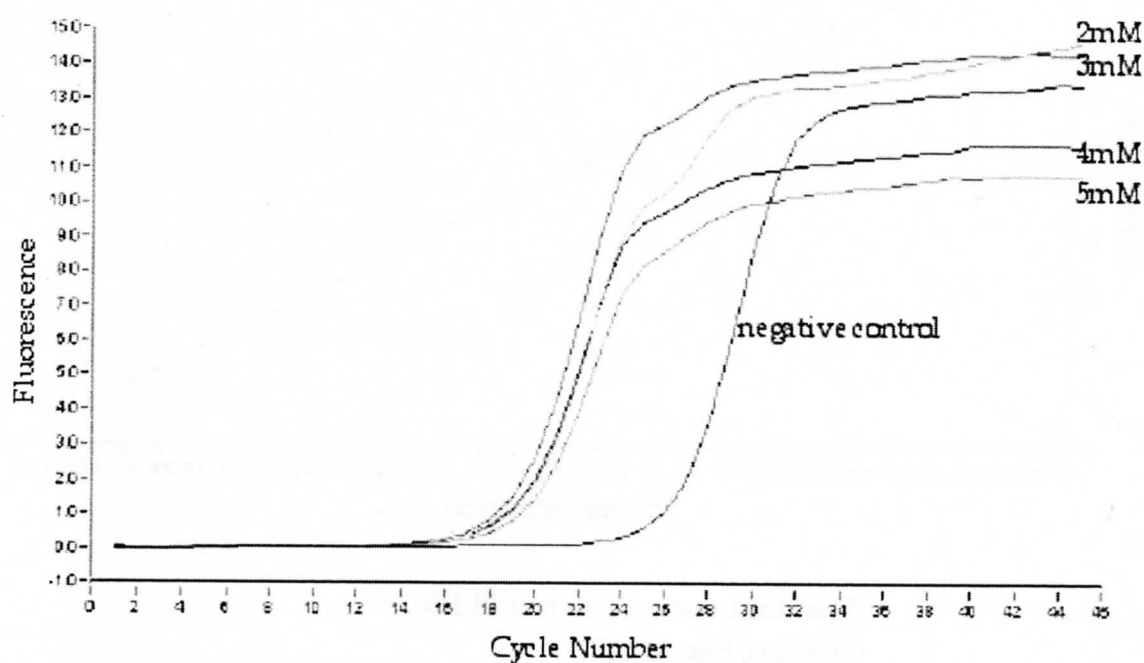
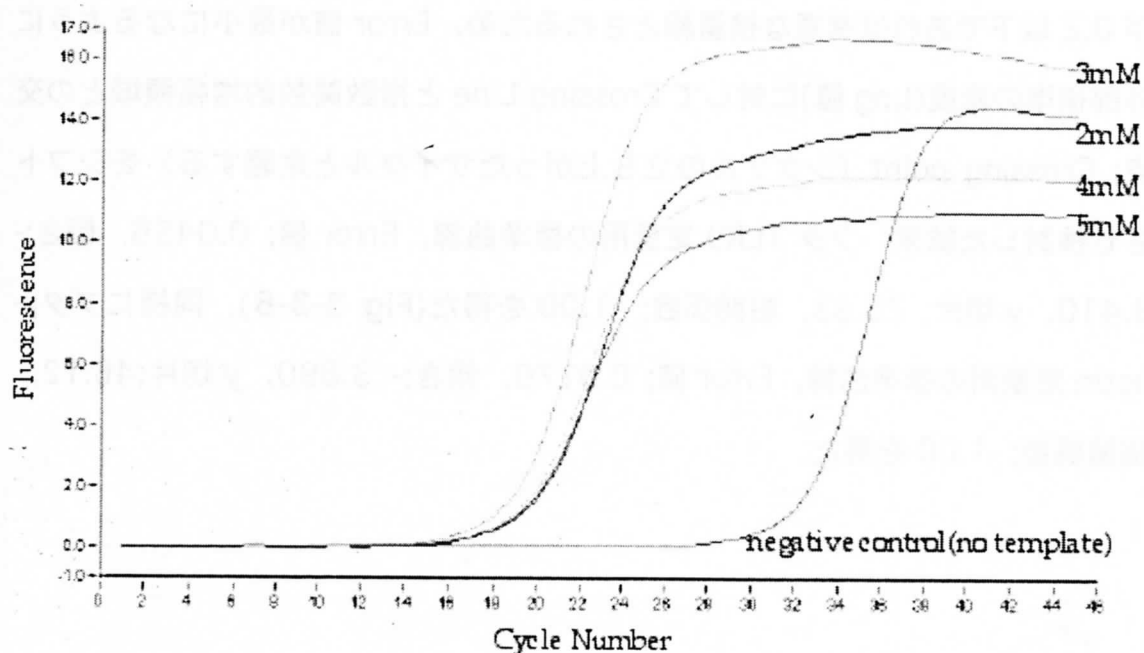
Real-time PCR 用にブタ TLR9 特異的 primer を設計した。すなわち、DNA 増幅サイズを 200bp 程度に設定し、CG 含量が 60%以上の増幅領域において GC 含量 50%、アニーリング温度が 55℃～60℃になるような 20mer の塩基配列とした。

Primer sequences used in the expression analysis of sTLR9 mRNA

Expression analysis primer	Forward primer	Reverse primer
swineTLR9	GTGGAAGCTGTTTGGCATC	CACAGCACTCTGAGCTTTGT
swineβ-actin	TGGCATTGTCATGGACTCTG	AGGGGCGATGATCTTGATCT

2-11) 最適 PCR 反応条件の検討

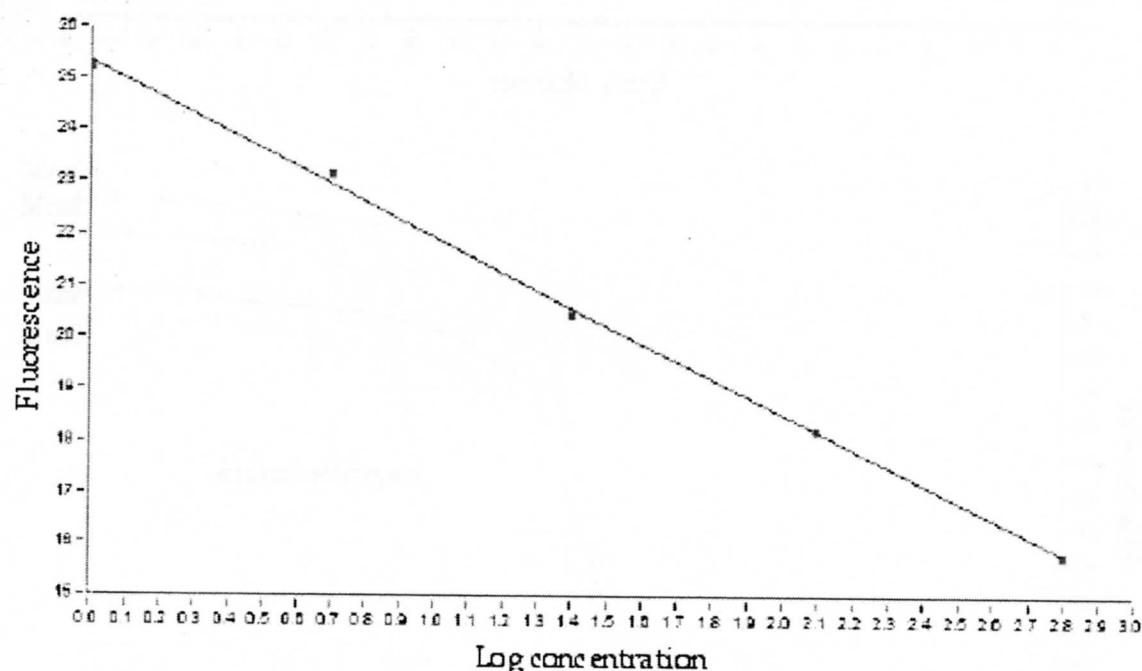
Real-time PCR 法において PCR 反応溶液中にしめる MgCl₂ 濃度は、増幅効率に大きな影響を与えるため、MgCl₂ 濃度を 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM とふって最適増幅効率を得る MgCl₂ 濃度を検討した結果、ブタ TLR9 ターゲット PCR 産物において 3mM、ブタβ-actin において 3mM の濃度において最大の増幅曲線を描いた。また融解曲線(Melting curve)分析より T_m 値(その 50%が 1 本鎖 DNA に融解する温度)はブタ TLR9 ターゲット PCR 産物において 93℃と高く、プライマーダイマーなどの非特異的 PCR 産物は検出されなかった。このことから蛍光強度取得温度を通常通り 72℃に設定することで目的の PCR 産物由来の蛍光のみを測定出来るものと期待された。また template 不含 Negative control における非特異的 PCR 産物においては 84.5℃であった。またブタβ-actin ターゲット PCR 産物においても 92℃と高く、ブタ TLR9 同様にプライマーダイマーなどの非特異的 PCR 産物は検出されず、蛍光強度取得温度を通常通り 72℃に設定することで目的の PCR 産物由来の蛍光のみを測定出来るものと期待された。



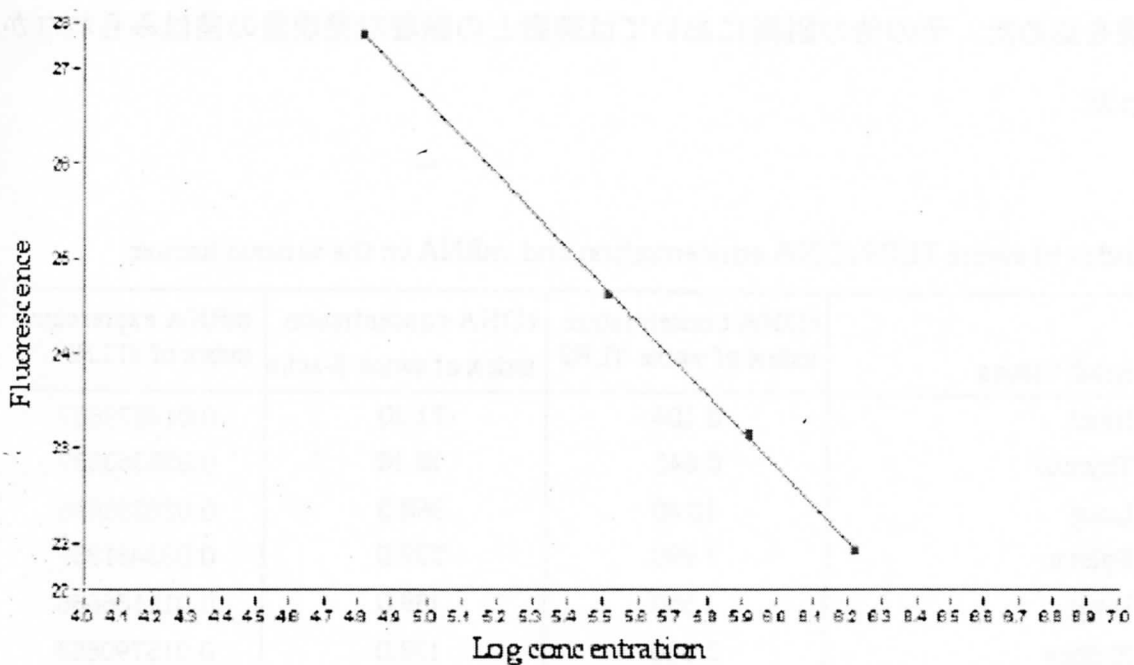
2-12)標準曲線の作製

IPC (Internal Positive Control) 配列を用いた $1.25 \times 10^{-12} \sim 10^{-16} \text{g}/\mu\text{l}$ のテンプレートからの増幅曲線から指数関数的増幅領域での Ct (Threshold Cycle) 値と蛍光強度から算出した標準曲線において評価した。誤差 (Error 値)

が 0.2 以下であれば有意な検量線とされるため、Error 値が最小になるように外部標準の濃度(Log 値)に対して Crossing Line と指数関数的増幅領域との交点; Crossing point (シグナルの立ち上がったサイクルと定義する) をシフトさせ検討した結果、ブタ TLR9 定量用の標準曲線, Error 値; 0.0456, 傾き;-3.410, y 切片; 25.33, 相関係数; -1.00 を得た(Fig 3-3-8). 同様にブタ β -actin 定量用の標準曲線, Error 値; 0.0170, 傾き;- 3.890, y 切片;46.12, 相関係数;-1.00 を得た.



Standard curve of swine TLR9
 Crossing line=0.1481
 Slope=-3.410
 Intercept=25.33
 Error=0.0456



Standard curve of swine β -actin
 Closing line=6.4787
 Slope=-3.890
 Intercept=46.12
 Error=0.0170

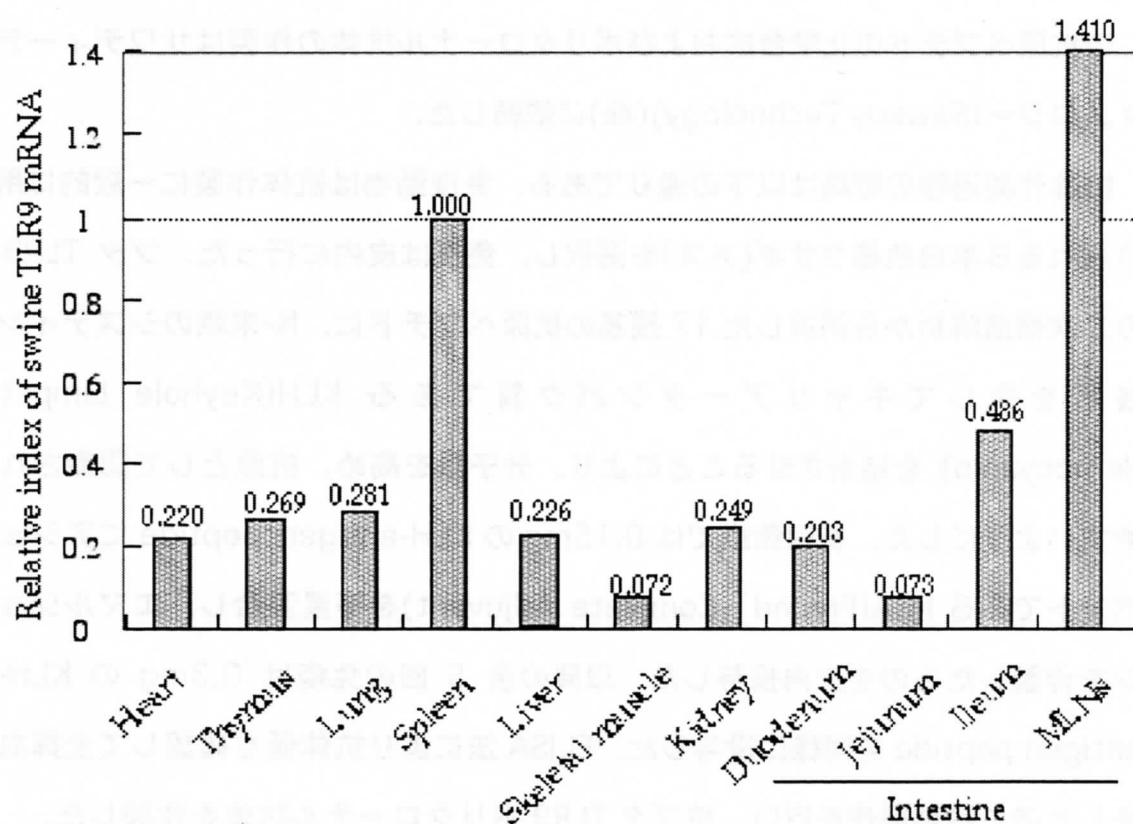
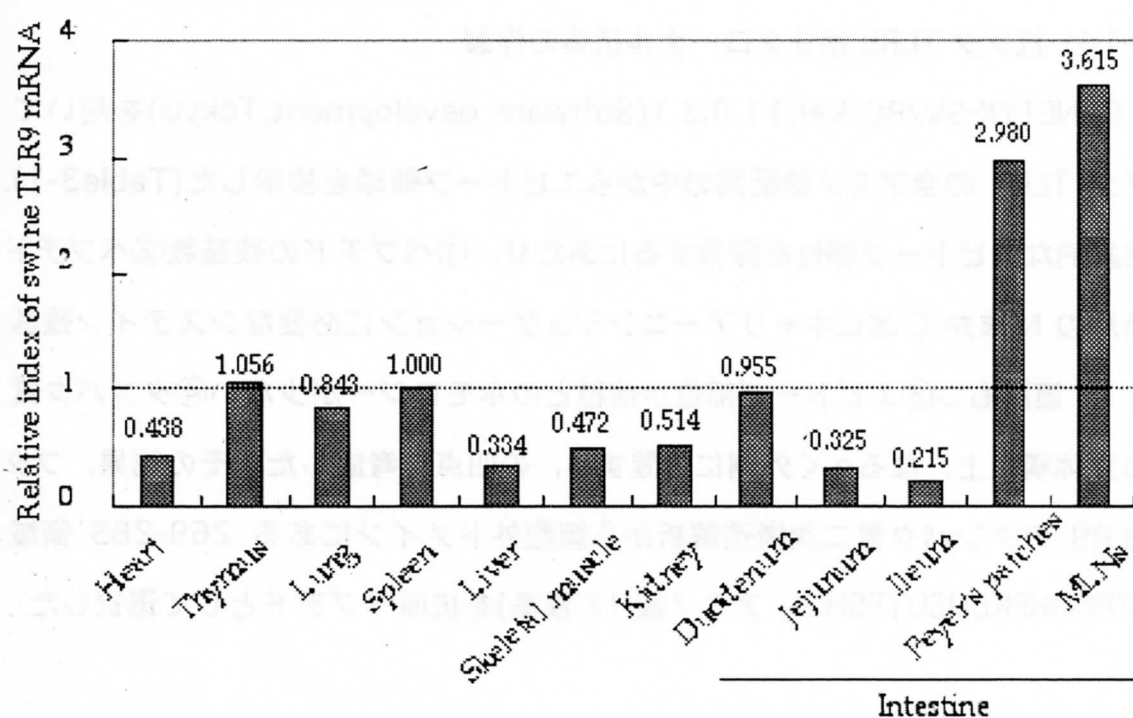
2-13) 各種組織中のブタ TLR9 mRNA 発現量の比較

各種組織由来 cDNA を template として Real-time quantitative PCR 法により増幅曲線を描き, 3-5) で求めた標準曲線を用いて組織中における TLR9 および β -actin cDNA 量を数値化した (ブタ TLR9/ β -actin cDNA concentration index). さらに TLR9 cDNA concentration index を house keeping gene; β -actin cDNA concentration index で除すことでブタ TLR9 mRNA expression index を算出し, 脾臓を 1.00 としたときの各種組織における Index を数値化した. その結果, 成ブタにおいて腸管免疫系を司るパイエル板と腸管膜リンパ節において脾臓の約 3 倍以上の高い発現を認めた. また, 初生仔ブタにおいては腸管膜リンパ節において脾臓の約 1.4 倍以上の発

現を認めた。その他の組織においては脾臓との顕著な発現量の差はみられなかった。

Index of swine TLR9 cDNA concentration and mRNA in the various tissues

Adult tissues	cDNA concentration index of swine TLR9	cDNA concentration index of swine β -actin	mRNA expression index of sTLR9
Heart	0.104	71.10	0.014673607
Thymus	0.642	18.10	0.035363837
Lung	10.40	368.0	0.028233696
Spleen	7.990	239.0	0.033481357
Liver	1.550	138.0	0.011186686
Kidney	2.810	178.0	0.015790658
Skeletal muscles	11.20	52.40	0.017205882
Duodenum	0.543	351.0	0.031974922
Jejunum	3.710	49.80	0.010888844
Ileum	37.90	51.50	0.007210250
Peyer's patches	2.010	380.0	0.099789196
Mesenteric lymph nodes	0.901	16.60	0.121024096
Neonatal tissues			
Heart	0.556	28.20	0.019740859
Thymus	1.340	55.60	0.024109392
Lung	0.277	11.00	0.025228102
Spleen	5.880	65.60	0.089720909
Liver	0.764	37.59	0.022815903
Kidney	1.240	193.0	0.006433022
Skeletal muscles	0.245	11.00	0.022374429
Duodenum	3.010	165.0	0.018236364
Jejunum	1.300	199.0	0.006564232
Ileum	2.340	53.50	0.043644860
Mesenteric lymph nodes	8.8	69.62	0.126400459



2-14) 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の作製

GENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1(Software development,Tokyo)を用いてブタ TLR9 の全アミノ酸配列の中からエピトープ領域を検索した(Table3-1). 特異的なエピトープ部位を探索するにあたり, ①ペプチドの残基数②ペプチド断片の N 末か C 末にキャリアーコンジュゲーションに必要なシステイン残基を 1 箇所もつ③エピトープ部位が他種とのホモロジーが少ない④タンパク質の立体構造上, なるべく外側に位置する, の四点を考慮した. その結果, ブタ TLR9 のタンパク質二次構造解析から細胞外ドメインにある 269-285 領域 (CPKDHPKLHSDTFSHLS, アミノ酸 17 残基)を抗原ペプチドとして選択した.

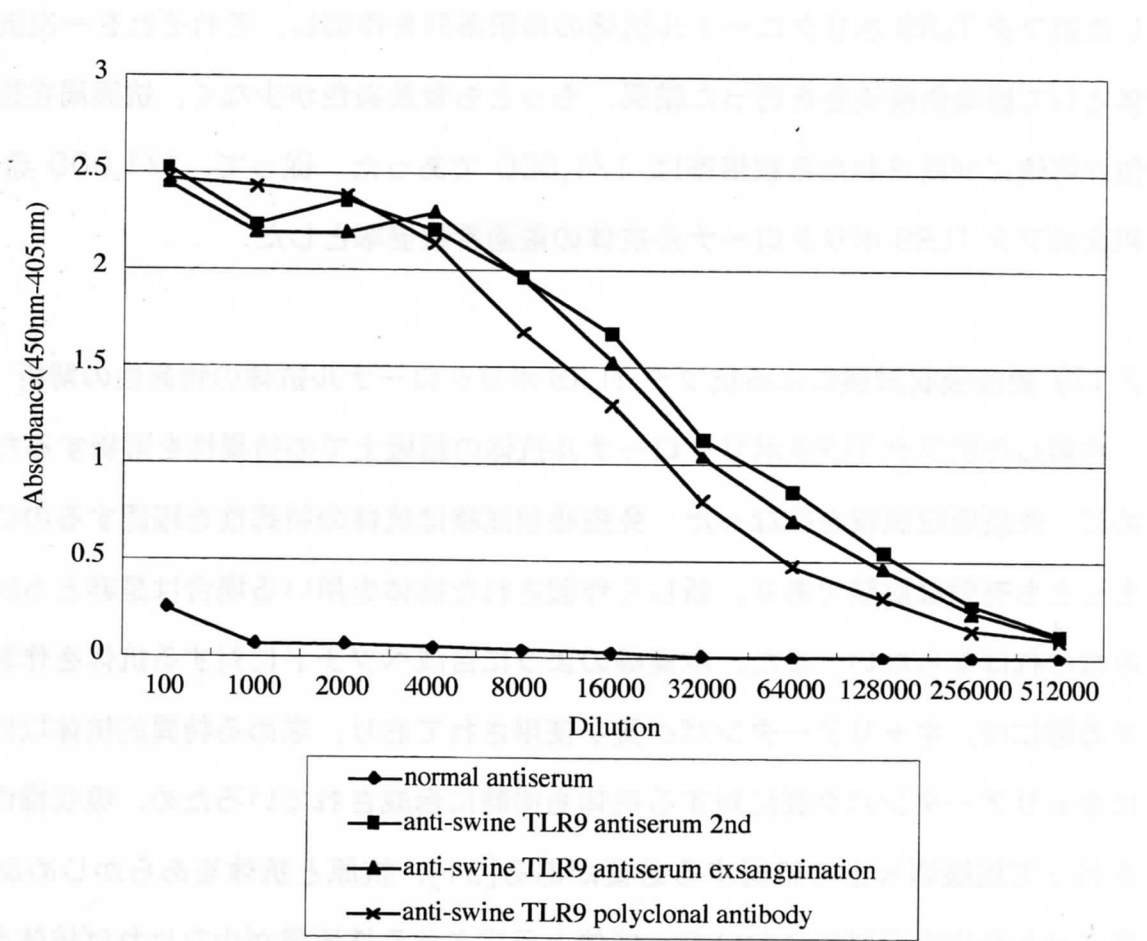
Epitope peptide (CPKDHPKLHSDTFSHLS)

この抗原ペプチドの化学合成およびポリクローナル抗体の作製はサワディータクノロジー(Sawady Technology)(株)に依頼した.

抗体作製過程の概略は以下の通りである. 免疫動物は抗体作製に一般的に用いられる日本白色種ウサギ(メス)を選択し, 免疫は皮内に行った. ブタ TLR9 の二次構造解析から選択した 17 残基の抗原ペプチドに, N-末端のシステイン残基を介してキャリアータンパク質である KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin) を結合させることにより, 分子量を高め, 抗原として認識されやすいようにした. 初回免疫では 0.15mg の KLH-antigen peptide にアジュバントである FCA(Freund' Complete Adjuvant)を等量混合し, エマルジョンを作製したものを皮内投与した. 以降の全 5 回の免疫は 0.3mg の KLH-antigen peptide を同様に投与した. ELISA 法により抗体価を確認して全採血をした後に精製操作を行い, 抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を作製した.

2-15) Enzyme-linked immunosobant assay(ELISA)法による抗体価の測定

ELISA 法を用いて、作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の正確な抗体価を測定した結果、作製した抗体が、希釈倍率にして 128,000～256,000 倍の高い抗体価を有するポリクローナル抗体であることが確認された。



Result of ELISA for antibody titer of anti-swine TLR9 polyclonal antibody

2-16) 組織免疫染色における抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の最適希釈倍率の決定

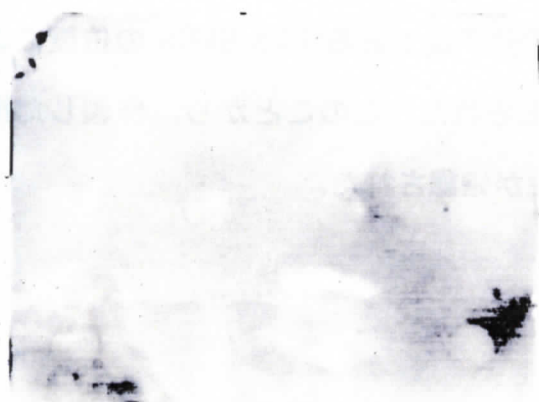
適格な抗原抗体反応を行うにあたり、適切な濃度の一次抗体を用いるために抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の最適希釈倍率を求めた。一次抗体の濃度が薄ければ、抗原局在部位はまったく染色されないか、抗原が大量に存在する部

位のみが染色される。また抗体の濃度が濃すぎれば、強い背景染色や発色産物の流出・拡散が生じる結果、抗原の濃度差のみならず、分布自体も確認できなくなる[30]。そこで ELISA 法によりもとめられた希釈倍率(128,000～256,000 倍)から約 100 倍濃い濃度の希釈倍率(1,280～2,560 倍)を中心にした抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の希釈系列を作製し、それぞれを一次抗体として組織免疫染色を行った結果、もっとも背景染色が少なく、抗原局在部位が明確に判断された希釈倍率は 1/1,000 であった。従って、1/1,000 希釈を抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の最適希釈倍率とした。

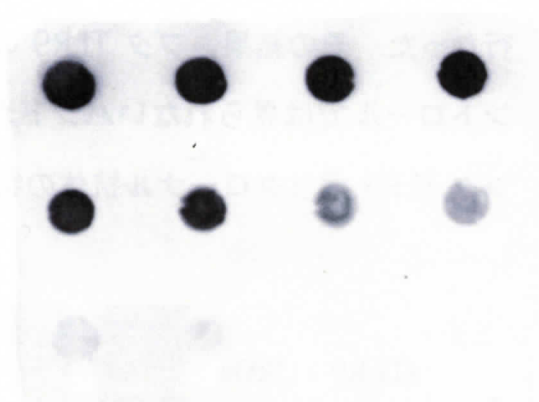
2-17) 免疫吸収試験による抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性の解析

作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の組織上での特異性を解析するために、免疫吸収試験を行なった。免疫吸収試験は抗体の特異性を確認するのにもっとも有効な試験であり、新しく作製された抗体を用いる場合は是非とも試みなければならない。また、本実験のように合成ペプチドに対する抗体を作製する際には、キャリアタンパク質が使用されており、求める特異的抗体以外にキャリアタンパク質に対する抗体も同時に合成されているため、吸収操作を行って組織切片上で確認する必要がある[31]。抗原と抗体をあらかじめ反応させる免疫吸収試験において、抗体と反応させる抗原量が少なければ抗体を完全に吸収できない一方で、抗原量が過剰になると、いったん形成された沈降物が溶解して soluble immune complex が生じる結果、染色陽性となる場合がある[30]。よって、ドットブロット解析によって最適希釈時の特異的抗体と適切に反応する抗原量を求めた。その結果、1/1,000 に希釈した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体が認識できる最低の抗原ペプチド量は、約 0.5ng であった。この抗原ペプチド量を指標として、約 10 倍量である 5ng を中心にした抗原ペプチドの希釈系列を作製して免疫吸収試験を行った結果、50ng の抗原

ペプチドとあらかじめ抗原抗体反応させた際に、組織上で抗体陽性部位が完全に消失した。このことから、作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の組織上での特異性が確認された。

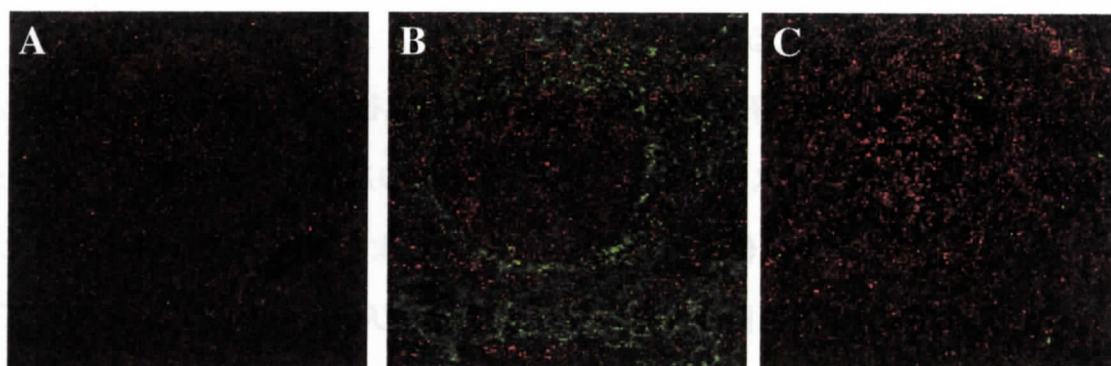


Control (2nd antibody only)



Anti-swine TLR9 polyclonal antibody

Dotblot analysis of antigen peptide for immunoabsorption test



A : Negative Control (Alexa488 only)

B : Positive Control (anti-swine TLR9 polyclonal antibody + Alexa488)

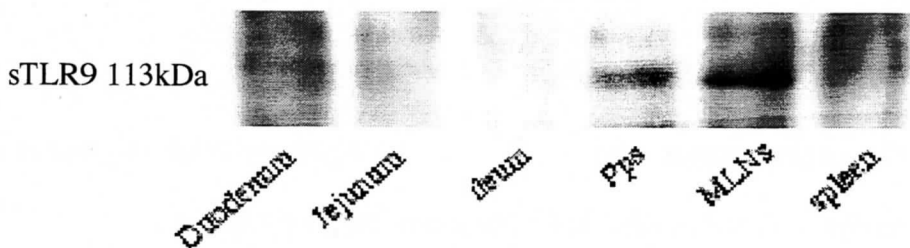
C : Immunoabsorption test (anti-swine TLR9 polyclonal antibody + antigen peptide; 50ng + Alexa488)

Result of immunoabsorption test

2-18) 組織由来の細胞抽出物を用いた抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性の解析

抗体の特異性を最終的に厳格に検定するには、ウエスタンブロット法によ

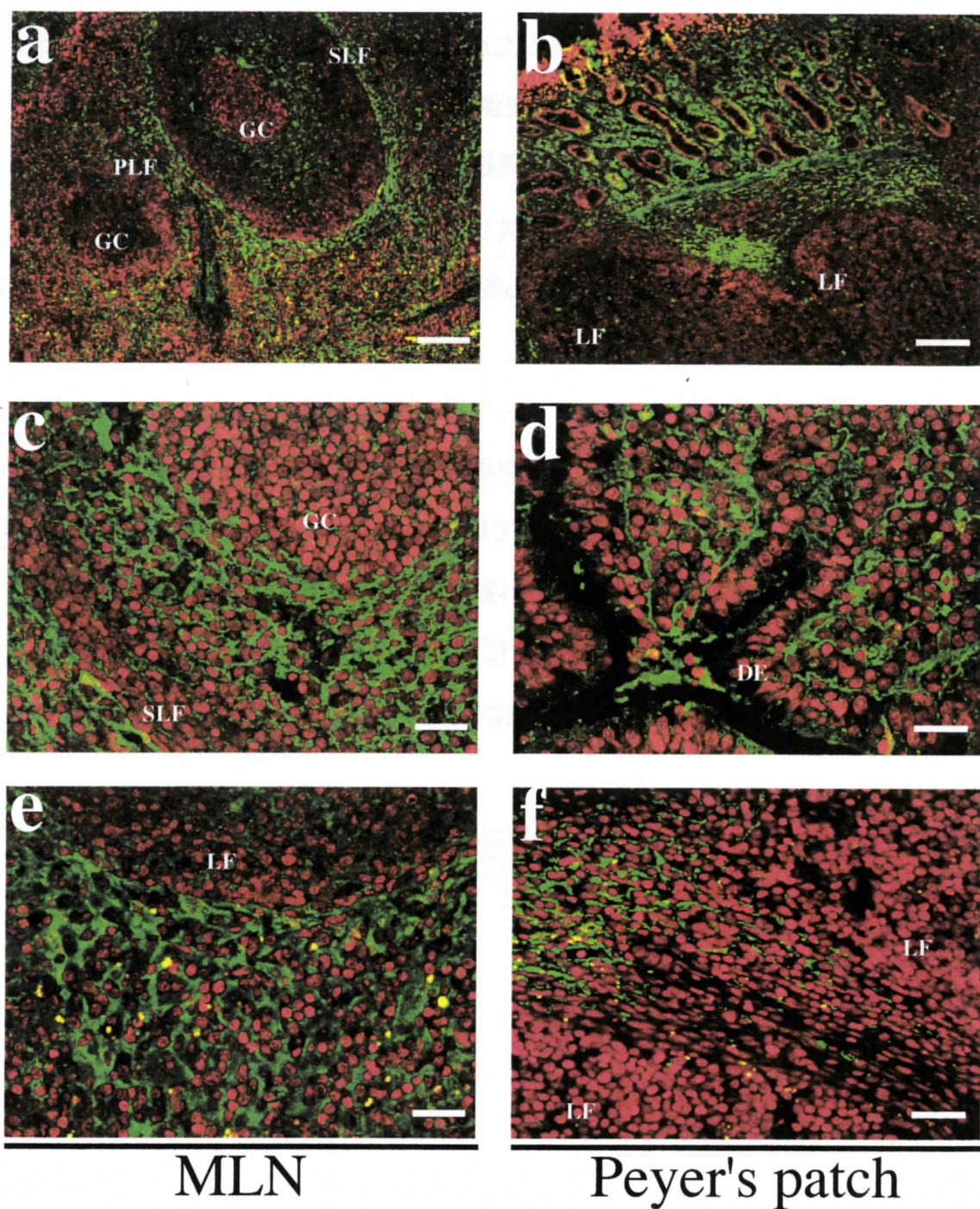
り、用いた抗体が対象とする組織ないし細胞の抽出物中のどの成分(どのような分子量をもつタンパク質)と反応するかを確かめる必要がある。本実験では、組織より細胞の抽出物を調整し、免疫沈降試験の後、ウエスタンブロット法により解析することで、抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性の検定を行なった。その結果、ブタ TLR9 の推定分子量である 115.9kDa の位置にコントロールでは見られないバンドが検出された。このことから、作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性が確認された。



2-16) 蛍光抗体法による組織免疫染色

成熟ブタおよび初生仔ブタから各種臓器を摘出後、ザンボニ液で固定し、凍結包埋した。クリオスタットで 10 μ m 厚前後の凍結切片を作製し、抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により組織免疫染色を行った。その結果、成熟ブタでは回腸由来パイエル板および腸管膜リンパ節において、タンパク質レベルでの TLR9 の発現が認められた。また、初生仔ブタでは成熟ブタと比べて、腸管膜リンパ節および一部の回腸において TLR9 のタンパク質レベルでの弱発現が認められた。一方で、ブタ TLR9 mRNA レベルでの陽性対照である脾臓をはじめとして、その他各種臓器ではタンパク質レベルでの発現が認められなかった。成熟ブタの回腸由来パイエル板では、特殊な上皮細胞である Membranous epithelial cells(M cells;M 細胞)が散在するドーム上皮において、円柱上皮細胞(follicle-associated epithelium : FAE)直下の

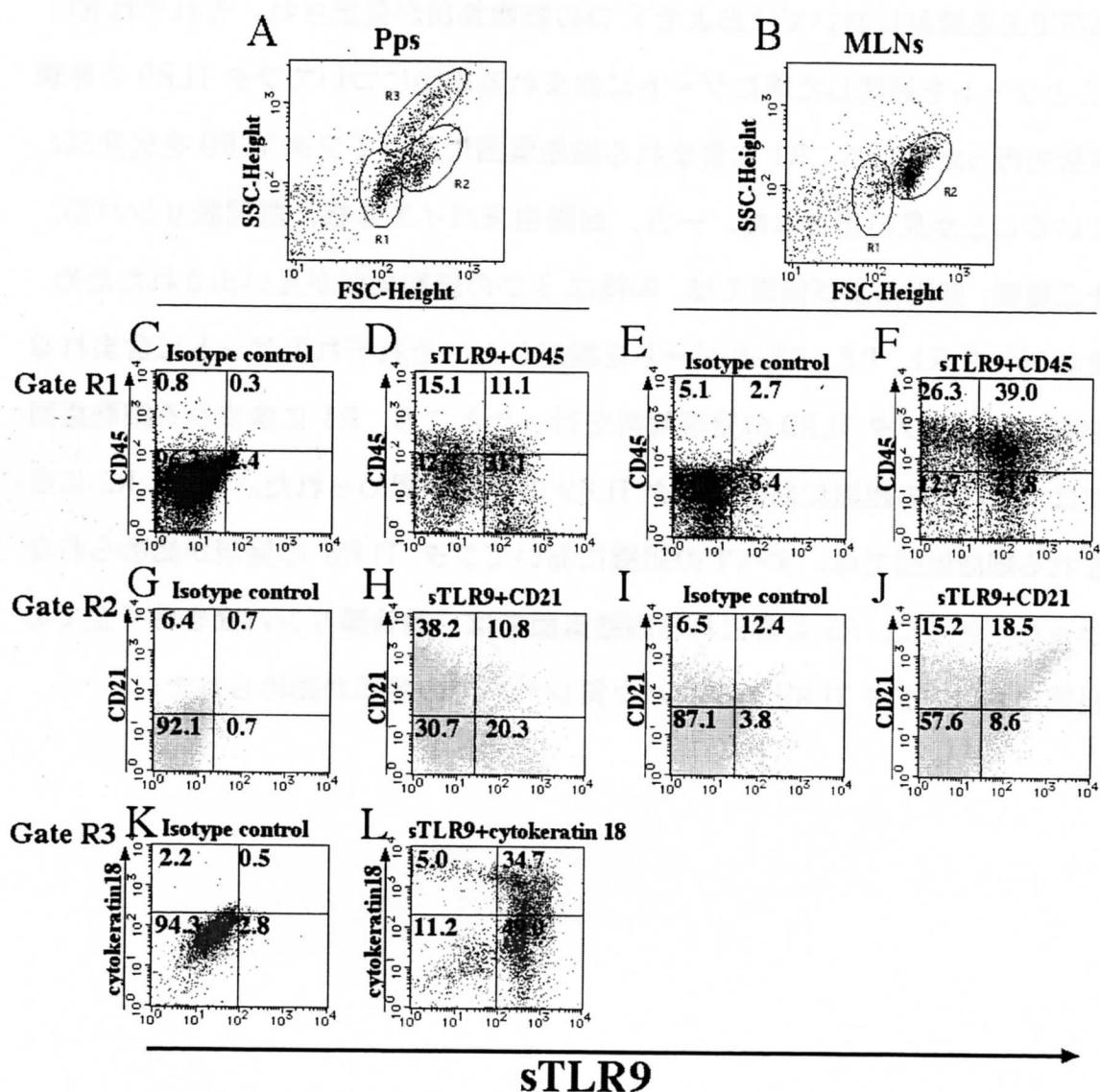
基底膜周辺領域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。また、コントロールを設定した場合、ドーム上皮側のリンパ濾胞間域にも TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。また同様に、コントロールを設定した場合、成熟ブタの腸間膜リンパ節では、一次リンパ濾胞においては濾胞内に、二次リンパ濾胞においては濾胞内の胚中心周辺領域に樹状細胞様の形態をした TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。また、リンパ濾胞間域にも TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。初生仔ブタの腸管膜リンパ節では、組織が未成熟なために、明確なリンパ濾胞構造が認められなかったが、弱発現ながら TLR9 を発現した細胞が散在しているのが見出された。また、初生仔ブタの回腸は組織が未成熟なために、外観上パイエル板などの免疫組織が確認できないが、偶然切片を作製した部位において認められたリンパ濾胞において、弱発現ながら TLR9 を発現した細胞が認められた。



2-17) フローサイトメトリー法による解析

詳細な細胞レベルでのブタ TLR9 の発現解析を行うために、各種組織より細胞を調製して抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体で染色した後、フローサイトメトリー法により検討した。その結果、ブタ TLR9 mRNA レベルでの陽性

対照である脾臓においてはおよそ 2 つの細胞集団が見出され、それぞれ R1, R2 とゲートを設定した後にゲートに含まれる細胞についてブタ TLR9 の発現解析を行ったところ、R1 に含まれる細胞集団においてブタ TLR9 を弱発現していることが見い出された。一方、回腸由来パイエル板、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸および回腸では、同様な 3 つの細胞集団が見い出されたため、それぞれを R1, R2, R3 とゲートを設定した。それぞれのゲートに含まれる細胞についてブタ TLR9 の発現解析を行ったところ、R1 に含まれる細胞集団では、すべての組織においてブタ TLR9 の発現が認められた。また、R2 に含まれる細胞集団では、すべての組織においてブタ TLR9 の発現が認められなかった。さらに、R3 に含まれる細胞集団では、腸管膜リンパ節を除く全ての組織においてブタ TLR9 のタンパク質レベルでの発現が認められた。

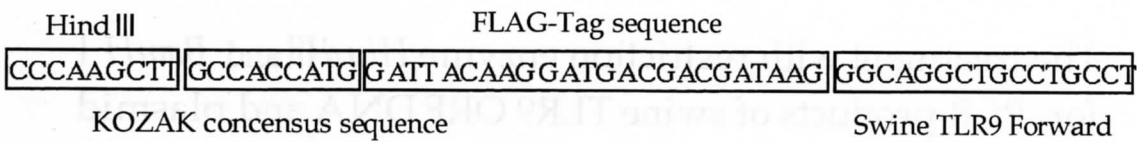


2-18) プライマー設計

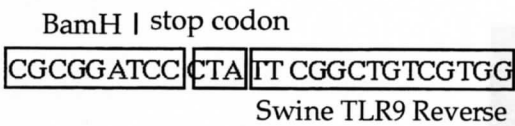
真核生物の mRNA も効率的なりボソームの結合に重要な配列, Kozak consensus 配列を有し, それは開始コドン AUG を含む ACCAUGG とされている[104]. -3(AUG コドンから 3 塩基上流)に位置するプリン残基(A or G)は, 翻訳効率に顕著な影響を与え, -3 の位置にピリミジン塩基(C or U)があると, -1/-2/+4 の変更が翻訳効率に, より多くの影響を与えるようになることがわかっている. -3 の位置がプリンからピリミジンに変更された場合, 発現レベルは最高 95%まで減少し, +4 の位置は影響が少なく約 50%の減少

が見られる。そこで、今回設計した pcDNA 発現ベクターに組み込むための DNA 増幅プライマー(Forward)には、FLAG consensus 配列 (GCCACCATG) を付加した。また開始コドンに続いて FLAG-Tag 配列 (GATTACAAGGATGACGACGATAAG) アミノ酸配列にして (DYKDDDDK) を付加した。ブタ TLR9 ORF からは SMART によるタンパクドメイン解析より明らかになったシグナルペプチド領域を除くように Forward プライマーを設計し、さらに Reverse プライマーは Stop コドンを含むように設計した。また、pcDNA3 マルチクローニングサイトに組み込むため Forward プライマーの 5' 側に制限酵素サイト *Hind*III を、Reverse プライマーの 5' 側には *Bam*HI を付加した。

Forward primer

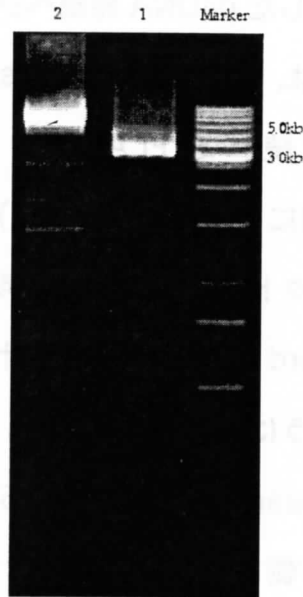


Reverse primer



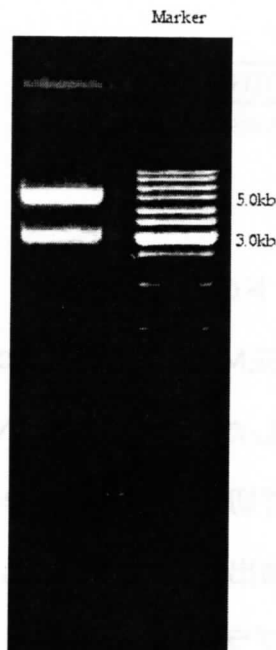
2-19) Transfection プラスミドの調製

ブタ TLR9ORF を含む pGEM-T-Easy vector を用いて、PCR 法により pcDNA3 導入用 DNA を増幅した。増幅した DNA および pcDNA ベクターを制限酵素 *Hind*III と *Bam*HI で切断し、agarose 電気泳動に供し目的のサイズの DNA バンドから DNA を抽出し Ligation 後、JM109 コンピテントセルに Transformation することでプラスミドを得た。そのプラスミドをさらに確認のため制限酵素 *Hind*III と *Bam*HI で切断し agarose 電気泳動に供し、pcDNA3 (約 5.4kb) とブタ TLR9 (3.1kb) のサイズにバンドが観られることを確認した。



1 *Hind*III-KOZAK-FLAG-Swine TLR9-*Bam*H I
2 pcDNA3 expression vector

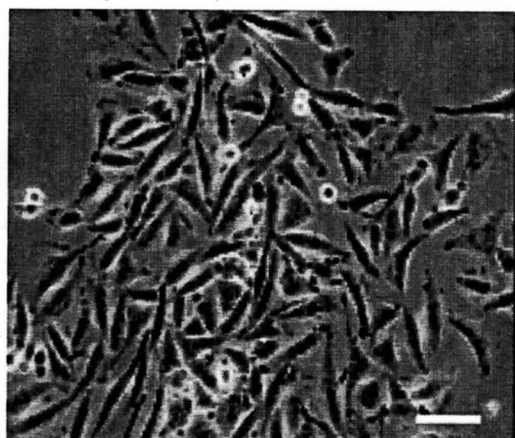
The treatment with restriction enzyme;*Hind*III and *Bam*H I for PCR products of swine TLR9 ORF DNA and plasmid vector(pcDNA3)



The treatment with restriction enzyme;*Hind*III and *Bam*H I for pcDNA3+*Hind*III-KOZAK-FLAG-Swine TLR9-*Bam*H I

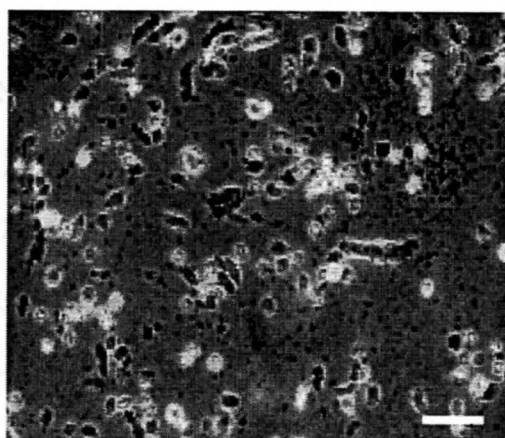
2-20) G418 二硫酸塩の最適濃度測定

G418(通称ジェネティシン)はゲンタマイシンに関連したアミノグリコシドであり、遺伝子工学の実験において選択試薬として使用されている。細菌、酵母、高等植物と哺乳類等の細胞および昆虫に毒性を示し、耐性遺伝子は優性でトランスポゾン Tn601(903)と Tn5 の双方に存在し、Tn5 上の遺伝子はアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ 3'(II)または APH(3')II と呼ばれ、一方 Tn601 上の遺伝子はアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ 3'(I)または APH(3')I と呼ばれている。これらの遺伝子は起源上は細菌性であるが、真核細胞においても発現させることが出来る。これらの遺伝子のいずれかを細胞に導入するとジェネティシンに対する耐性を細胞に付与することができ、ジェネティシンを含む培地中でその細胞を増殖させることが出来る。本実験において発現ベクターとして使用した pcDNA3 は、ネオマイシン耐性遺伝子、すなわちジェネティシンに対する耐性をもつ遺伝子領域を含むベクターである。そこでトランスフェクタントのセレクションにはジェネティシン含む培地を用いるため、その最適濃度の検定を行った。その結果、G418 二硫酸塩 0.5mg/mL, 0.8mg/mL, 1.0mg/mL, 1.2mg/mL, 1.5mg/mL, 2.0mg/mL の中で、3 日目あたりから弱り始め、1 週間以内に全滅した濃度は 1.0mg/mL 以上であった。このことから G418 二硫酸塩 1.0mg/mL をトランスフェクタントのセレクション最適濃度として決定した。さらに、0.5mg/mL であっても約 2 週間で全滅することが分かった。



Bar=20 μ m

Before treatment



Bar=20 μ m

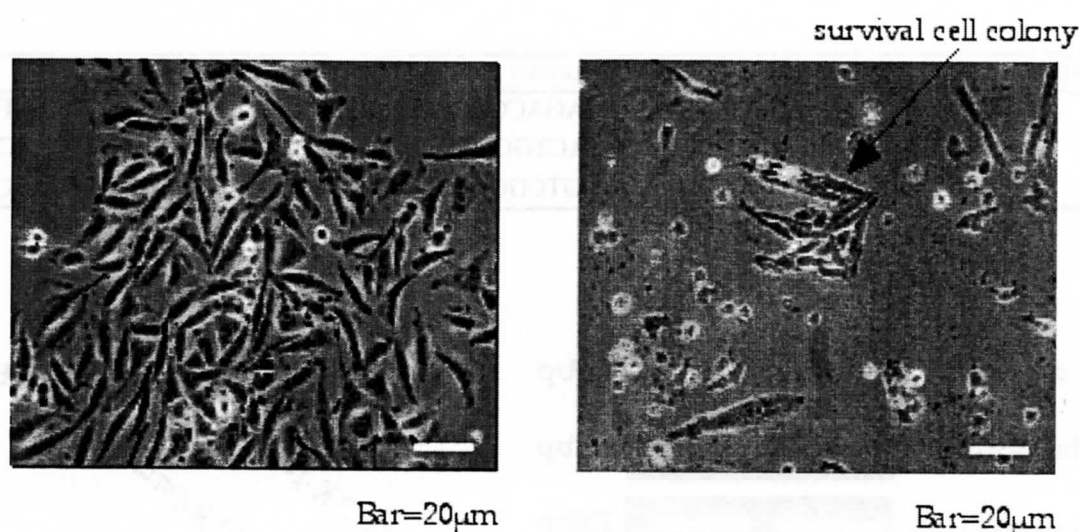
After treatment

The treatment with G418 disulfate for CHO K-1 cells

3-4) リポフェクション法による遺伝子導入

リポソームすなわちカチオン性脂質を至適条件下で水中にて調製すると、小さな（平均100～400nm）単層のリポソームが形成される。これらのリポソームの表面は正に荷電しており、負に荷電した細胞膜表面やDNAのリン酸骨格によって静電的に引きつけられ、カチオン性脂質試薬を用いる導入法の原理は中性リポソームを用いてトランスフェクトさせる従来の方法とは異なっている。カチオン性脂質を用いた場合、DNA溶液はリポソーム内に包み込まれることはなく、負に荷電したDNAが正に荷電したリポソームに自発的に結合してDNA-カチオン性脂質複合体を形成する。約5 kbの一本鎖プラスミドに2～4個のリポソームが結合すると考えられている。こうして捕捉されたDNAが培養細胞に導入され、DNAはエンドソームやリソソームを介して導入されることを示す所見が得られている。トランスフェクションに伴う問題として、DNA導入の効率が低いこと、選べる細胞種が少ないこと、再現性が低いこと、細胞毒性、不自由なことなどが挙げられるが、カチオン性脂質によるトランスフェクションでは収量が高く、多様な真核細胞において従来にないトランスフェク

ション効率達成でき、操作は簡単で、一貫して再現性のある結果が得られている。さらに、他の方法ではトランスフェクションが難しいいくつかの細胞株においても、カチオン性脂質を用いると遺伝子導入することができる。リン酸カルシウム法とは異なり、カチオン性脂質によるトランスフェクションでは必要とするDNA量は比較的少量で、キャリアDNAも必要としない。本実験においてはinvitrogenのリポフェクタミンを用いてリポフェクション法により遺伝子を哺乳類細胞へ導入した。また3-3)にて得られたジェネティシン1.0mg/mLを含む培地を用いたセレクションによりネオマイシン耐性遺伝子を持たない細胞、すなわち遺伝子が導入されなかった細胞は死滅し、その中で残った細胞、遺伝子が導入されたと思われる細胞が増殖を続けた(Fig 4-3-4)。残った細胞を継代し続け、発現解析、取り込み解析に用いた。



Resistant ability of transfectant for G418 disulfate

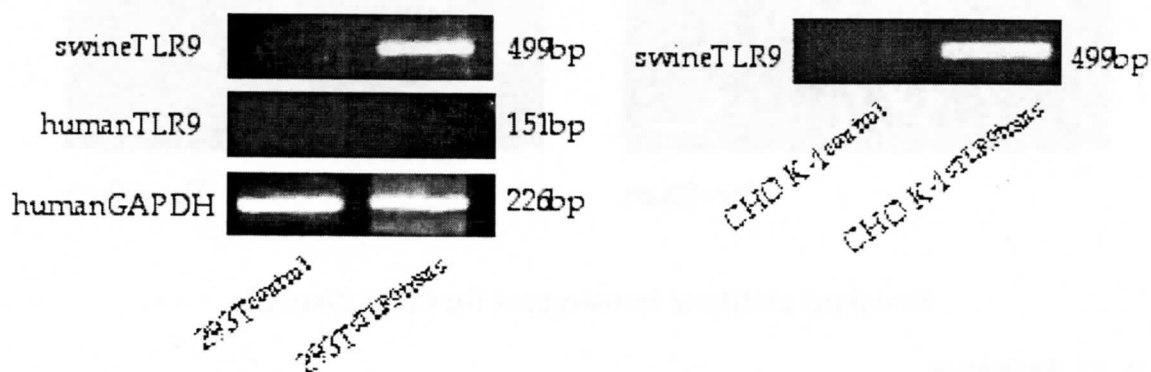
3-5) 発現解析

トランスフェクタントにおけるブタ TLR9 遺伝子の発現解析は遺伝子レベル、すなわち mRNA のレベルにおいては Table 4-2-4.のブタ TLR9 特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により解析した。トランスフェクタント作製に用いた

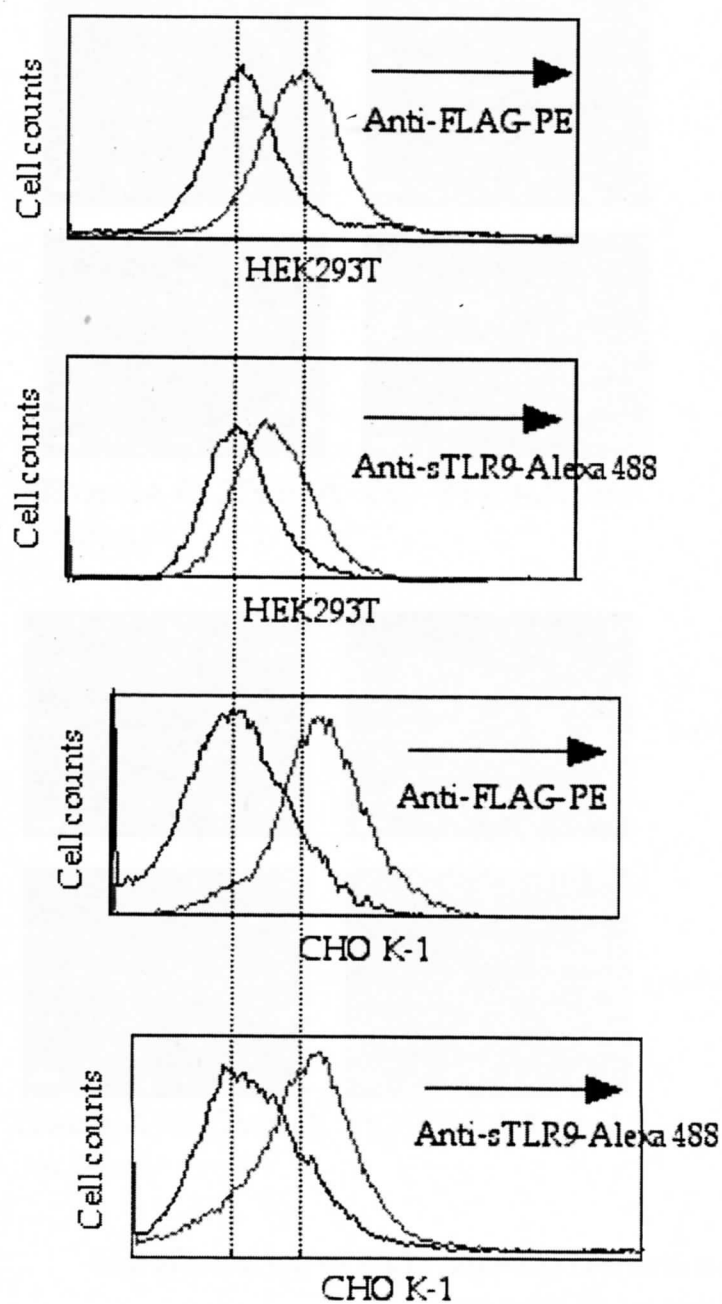
宿主細胞はヒト胎児腎細胞(HEK293T)とチャイニーズハムスター卵巢細胞(CHO K-1)であるが、HEK293T に関してはヒトにおいて既に TLR9 はクローニングがなされているため、ヒト TLR9 特異的プライマーを用いてコントロール HEK293T 細胞における TLR9 の発現も確認した。その結果、HEK293T, CHO K-1 細胞ブタ TLR9 トランスフェクタントにおいて、ブタ TLR9 mRNA の発現が観られた。またコントロール HEK293T 細胞ではヒト TLR9 mRNA の発現が弱く、ほとんど発現していないことが判明した。

また、Anti- FLAG 抗体および Anti-swineTLR9 抗体を用いたフローサイトメトリー法およびレーザー顕微鏡による解析結果からも 3-4)にて残存し、増殖した細胞がブタ TLR9 遺伝子を発現し、タンパクレベルにおいても発現していることが確認された。

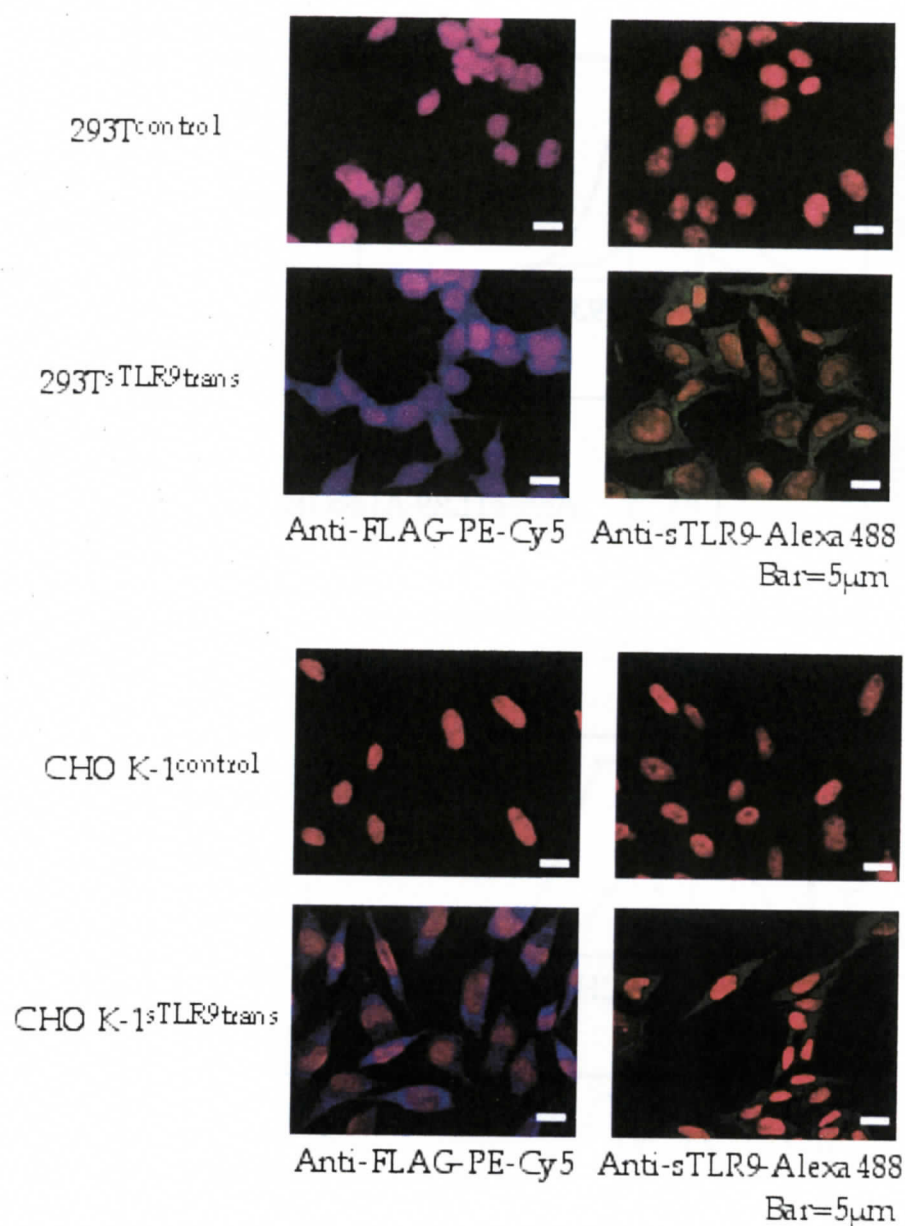
Expression analysis primer	Forward primer	Reverse primer
swineTLR9	CTGAAAGTCCTAGACGTGAG	TCTTGCCAGGTAACCAAGTCT
humanTLR9	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA	AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT
humanGAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC



Expression assay of swine TLR9 mRNA in the transfectant by RT-PCR



Protein expression analysis of swine TLR9
in the transfectants by flowcytometry

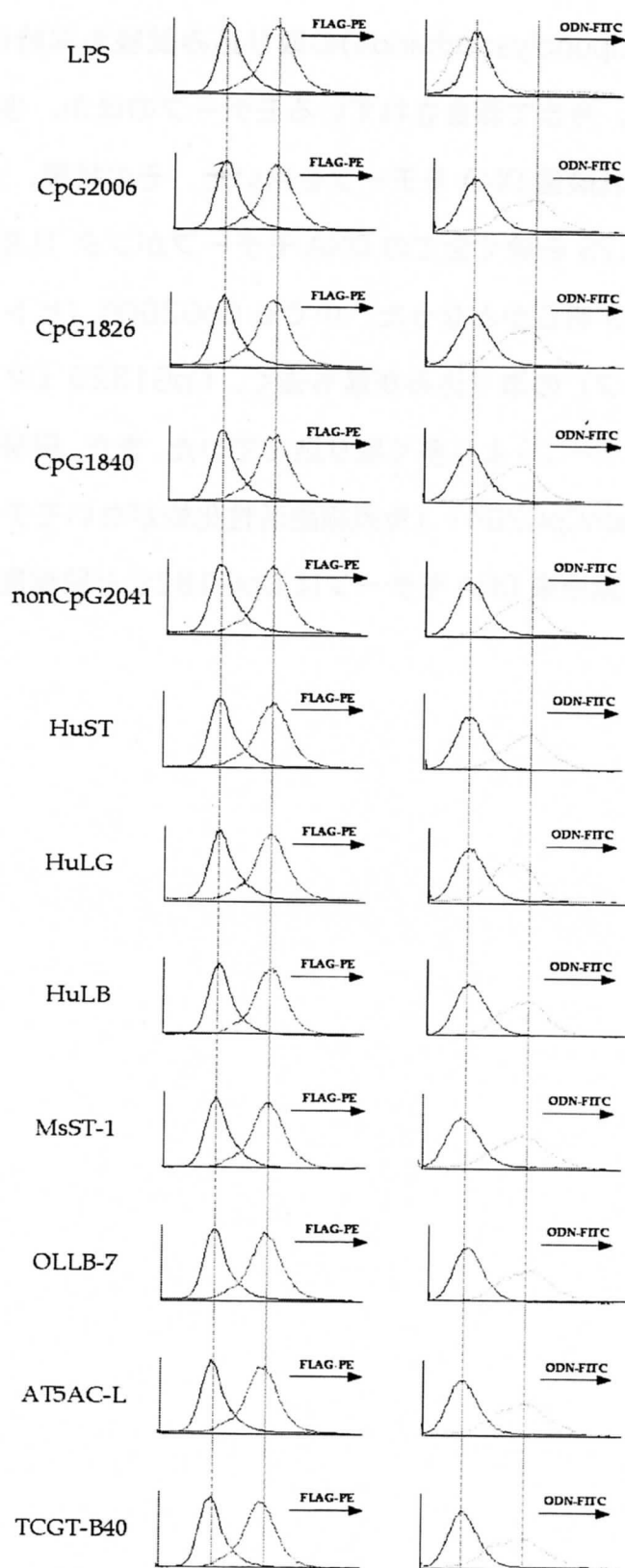


Expression analysis of swine TLR9 in the transfectant
by confocal-laser microscopy

3-8) CpG DNA 取り込み解析

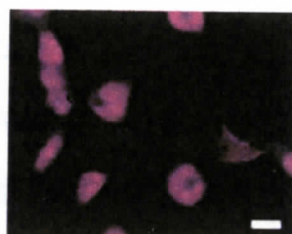
HEK293T 細胞のトランスフェクタントは細胞状態が安定せず、弱りやすかったため、CpG DNA の取り込み解析には CHO K-1 細胞のトランスフェクタントを用いることにした。また、negative コントロールとして TLR4 のリガ

ンドである LPS(Lipopolysaccharide)の取り込み試験も同時に行った。DNA モチーフとしては、今まで報告されているモチーフのほか、当研究室で見出している免疫賦活化乳酸菌 DNA モチーフを用いた。その結果、negative コントロール である LPS を除く全ての DNA モチーフがブタ TLR9 を介して取り込まれていることが明らかとなった。中でも CpG2006（ヒト免疫細胞を強く活性化するモチーフ）の取り込みが最も強く、CpG1826（マウス免疫細胞を強く活性化するモチーフ）より多く取り込んでいた。また、興味深いことに CpG 配列を持たない nonCpG2041（免疫細胞活性化能がないモチーフ）も取り込まれていた。乳酸菌由来 DNA モチーフは CpG 1826 と同程度の取り込みが認められた。

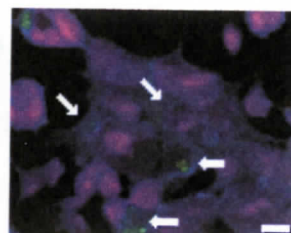


CpG DNA uptake by the swine TLR9 transfectant

Anti-FLAG
CpG2006 uptake

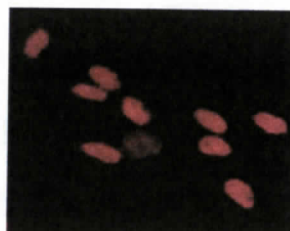


293T^{control}

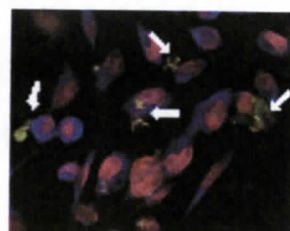


293T^{TLR9trans}

Anti-FLAG
CpG2006 uptake



CHO K-1^{control}



CHO K-1^{TLR9trans}

Uptake of CpG 2006 by the transfectants
 Green: CpG2006(FITC)
 Red: Nuclei(SYTOX orange)
 Blue: FLAG(PerCP)

3. 考察

食べるということは、生存のために必要な行為であり、それは食欲という基本的な本能を満たす手段である。人類の歴史から見ると、十分に食べられない時代の方が圧倒的に長く、人体は飢餓に耐え得るような体質を獲得したと考えられている。しかし、現代社会は食べ残しの多さが社会問題になるほど、飽食の時代とも呼ばれ、食べることが生命維持・健康維持ではなく、楽しみとなった反面、健康を損なう問題を引き起こすようになってきている。生活習慣・食習慣のひずみがもたらす肥満、高脂血症、高尿酸血症、糖尿病、痛風などの病気が増加し、中年以降で様々な合併症による著しい生活障害が引き起こされる原因となっている。「生活習慣病」(Life-style related diseases)の定義は、

「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が、その発症・進行に関与する疾患群」と規定され、インスリン非依存性糖尿病（成人型糖尿病）、肥満、高脂血症（家族性を除く）、高尿酸血症、循環器疾患（先天性を除く）、大腸癌（家族性を除く）、高血圧症、肺扁平上皮癌、慢性気管支炎、肺気腫、アルコール性肝障害、歯周病などが含まれる。糖尿病、高血圧症、心臓病、脳卒中、動脈硬化症、高脂血症、大腸がんなどは、疾病の発症や進行に個人の生活習慣が深く関与していることが明らかになり生活習慣病と呼ばれるようになった。

我が国において、1960年代から健康効果をうたった健康食品が商品化され、1970年代には大きな市場が形成された。1980年代半ばには科学的な証明に基づく食品の栄養、嗜好性以外の三次機能として、疾病の予防などの効果を有する「機能性食品」の概念が世界に先駆けて提唱された。しかし、薬事法のしりから「機能性食品」という呼称は使えず、1990年に栄養改善法第12条（又は同法第15条第1項）の範囲で法的に「特定保健用食品」として制度化さ

れた。これは厚生大臣の許可を受けなければならないものとして国が食品に健康表示(健康への効用を示す表現)を許可する世界で初めての画期的な制度で、平成 3 年に発足し、世界各国からも注目されている[115]。特定保健用食品は具体的には、身体の生理学的機能や生物学的活動に関与する特定の保健機能を有する成分を摂取することにより、健康の維持増進に役立ち、特定の保健の用途に資することを目的とした食品である。さらに、平成 13 年 4 月の保健機能食品制度創設に伴い、さらなる安全性や有効性を確保する観点から、食品衛生法施行規則第 5 条に基づく保健機能食品の一つとしても位置付けられた。特定保健用食品として許可等を受けるには、基本的に、特定保健用食品の"許可等の要件"を満たす必要があり、なおかつ、特定保健用食品に表示できる"保健の用途の表示の範囲"を逸脱しないものである必要がある。また保健の用途の表示は、健康の維持増進に役立つ、又は適する旨を表現するものであって、明らかに医薬品と誤認されるおそれのあるものであってはならない。平成 16 年 1 月 30 日現在、特定保健用食品の表示を許可している食品は 410 品目、表示承認されている食品は 2 品目となり、まさに食品と医薬品との境界領域の新食品として期待されている。その概念はイギリスやアメリカにも伝播し、代替補助食品(alternative supplement)という形で確立されている。

1993 年に WHO(世界保健機構)が世界人口の 3 分の 1 をこえる人々が、結核菌に感染しているという「世界非常事態宣言」を出している。これは抗生物質の開発により撲滅していたと考えられていた結核菌が抗生物質に対する耐性を持つようになり全世界にはびこるようになったためである。こうした現象は薬剤に頼りきってきた現代医学に対し大きな衝撃を与えると同時に、薬や手術に頼らない疾病の予防策として、特定保健用食品の概念が注目されるきっかけともなり、人間が本来持つ能力の回復・維持力に真剣に取り組む重要性が食品業界にも大きな影響を与えた結果であると言える。

腸管由来の乳酸菌は保健効果を有することが知られ、ヨーグルトなどの発酵乳製品に広く利用されてきた。近年、このような発酵乳製品は機能性食品として注目が集められているものの一つである。乳酸菌を利用した発酵製品は、様々な機能性成分を含むことが明らかとなり、機能性食品の開発に乳酸菌の利用法の開発が重要視されるようになってきている。近年では、プロバイオティクス (Probiotics); 「腸内の常在菌叢 (フローラ) を改善することにより、宿主に利益をもたらす、単一あるいは複数菌株からなる生きた培養菌」 [116], ビフィズスファクターであるフラクトオリゴ糖などのプレバイオティクス (Prebiotics); 「結腸内のプロバイオティクスを含む有用菌のみの増殖を促進し、その活性を高めることによって、宿主の健康に有利に作用する難消化性食品成分」 [117], さらにプロバイオティクスとプレバイオティクスの機能を併せ持つものをシンバイオティクス (Synbiotics) [118,119] など新たな用語が身近になってきている。一方、新機能性食品としてバイオジェニクス (Biogenics) が提案された [120]。これは「腸内フローラを介することなく、直接、免疫賦活、コレステロール低下作用、血圧降下作用、整腸作用、抗腫瘍効果、抗血栓、造血作用などの生体調節・防御、疾病予防・回復、老化制御などに働く食品成分」とされている。欧州においてはプロバイオティクスの様々な疾患に対する臨床効果、作用メカニズムの解明などについて学術的な研究を推進する機運が高まっており、予防医学が重要視されている今日、我が国においても大学および食品メーカーの研究開発が活発化している。

乳酸菌の働きとして知られている作用には、腸の蠕動運動の促進、腸内菌叢バランスの調整、有害菌繁殖の抑制、免疫機能の向上などが挙げられる [121]。現在、乳酸菌の新規機能の開発や特定保健用食品としての新しい健康表示 (Health Claim) も強く望まれている中で、プロバイオティクスの菌体成分にヒトの免疫系を刺激して感染防御や癌に対する抵抗力を高める働きのあること

も報告されてきており[122-130]、今後、免疫応答を調節する分子メカニズムを解明する研究の発展が期待されている。

当研究室では以前より発酵乳、乳酸菌の生理活性に興味関心を持ち、免疫賦活化を誘導する乳酸菌由来活性因子の同定を進めてきた。これまでに、乳酸菌が生産する菌体外多糖、菌体細胞壁成分、染色体 DNA および DNA モチーフが免疫賦活化作用を有することを見出した[41-50]。一方、医学、免疫学の分野においては、1995 年の大腸菌由来 CpG DNA モチーフが B リンパ球を刺激するという Krieg らの報告[109]以来、病原細菌由来の DNA モチーフのもつ免疫賦活化作用に関する研究が盛んに行われてきた[131-145]。また、2000 年にはその DNA モチーフのレセプターとして Toll-like receptor(TLR)9 が同定され[26]、機能性 DNA の TLR9 を介したシグナル伝達経路の解明されてゆくものと考えられている。これらの事実は、病原細菌由来 DNA を乳酸菌由来 DNA へと置き換え、経口的に摂取可能な食品として利用可能なモチーフを用いることで、免疫賦活化作用を発揮する機能性食品の開発が可能であることを示すものである。しかし、食品として有効な保健効果が認められるためには、作用機序の解明、再現性、効能の範囲など科学的に証明されることが必要となっている。本研究では、ヒトモデル系としてのブタを用いた実験系における、プロバイオティック乳酸菌由来 DNA モチーフの免疫賦活化作用を解明することにより、乳酸菌を用いた機能性食品の開発のための基礎を築くことを目的とした。

本研究により得られた知見は以下のとおりである。

①ブタ TLR9 遺伝子をクローニングし、その配列を決定した結果、ブタ TLR9 はマウスに比べ、ヒトやネコ TLR9 と高い相同性を示すことが明らかとなり、消化器系がヒトに近いブタがマウスよりも優れたヒトモデル系となりうることを示唆された。②Real-time PCR 法による各種臓器における発現解析から、こ

れまで TLR9 は脾臓において強い発現が認められると報告されていたが、経口的に病原細菌に曝される可能性が最も高い腸管粘膜系の中で、腸管免疫において中心的な役割を果たすパイエル板や腸管膜リンパ節において、脾臓の約 3 倍以上の mRNA 発現が認められ、大変興味深い新知見を得た。③ブタ TLR9 のエピトープ解析とタンパク質 2 二次構造解析から、細胞外ドメインにある 269-285 領域(CPKDHPKLHSDTFSHLS, アミノ酸 17 残基)を抗原ペプチドとして選択し、化学合成した抗原ペプチドをウサギに免疫することで、抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を作製した。④免疫沈降試験、ウエスタンブロット解析および免疫吸収試験により、作製した抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体の特異性を解析した結果、抗体の特異性が認められた。⑤抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた組織免疫染色の結果、成熟ブタにおいて、FAE 直下の基底膜周辺領域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。よって、M 細胞の上皮細胞間ポケットに入り込んだ B 細胞、マクロファージおよび IDC などが TLR9 を発現している可能性が示唆されると同時に、基底膜にへばりつくようにして存在する筋繊維芽細胞が TLR9 を発現している可能性も考えられる。さらにドーム上皮側のリンパ濾胞間域にも TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。この領域は T 細胞や樹状細胞が数多く存在しているといわれる傍濾胞域に相当し、TLR9 陽性細胞が形態学的に樹状細胞様の形態をしていることから、M 細胞などから取り込まれた乳業用乳酸菌を含む微生物由来の非メチル化 CpG DNA モチーフが、TLR9 を発現した樹状細胞を活性化させて免疫賦活化作用をもたらしていることが強く示唆される。一方、濾胞域内には TLR9 を発現した細胞が認められなかったことから、B 細胞および FDC はタンパク質レベルでの TLR9 の発現が弱いことが示唆された。⑥抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を用いた組織免疫染色の結果、成熟ブタにおいて、一次リンパ濾胞においては濾胞内に、二次リンパ濾胞においては濾胞内の胚中心周辺領域に樹

状細胞様の形態をした TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。しかし、回腸由来パイエル板では濾胞域内に TLR9 陽性細胞は認められておらず、基本的なリンパ濾胞構造は同じでありながら、組織によってリンパ濾胞における TLR9 の発現に違いが見られるという興味深い結果が得られた。⑦組織免疫染色の結果、成熟ブタの回腸由来パイエル板では、円柱上皮細胞直下の基底膜周辺領域およびドーム上皮側のリンパ濾胞間域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。成熟ブタの腸間膜リンパ節では、一次リンパ濾胞においては濾胞内に、二次リンパ濾胞においては濾胞内の胚中心周辺領域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。また、リンパ濾胞間域にも TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。初生仔ブタの腸管膜リンパ節では、弱発現ながら TLR9 を発現した細胞が散在しているのが見出され、一部の回腸にも弱発現ながら TLR9 を発現した細胞が認められた。一方で、mRNA レベルでの陽性対照であった脾臓をはじめ、その他の組織では発現が認められなかった。⑧フローサイトメトリー解析の結果、成熟ブタの脾臓においては TLR9 を弱発現している細胞集団が認められた。成熟ブタの回腸由来パイエル板、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸および回腸では、R1 の細胞集団において、TLR9 を発現していることが認められた。また、腸管膜リンパ節を除く全ての組織において認められた R3 の細胞集団において、TLR9 を発現していることが認められた。⑨DNA モチーフの評価系として利用可能な、動物細胞を用いたブタ TLR9 を強制発現させたトランスフェクタントの作製に成功した。本トランスフェクタントを用いた病原細菌(*E.coli*)および当研究室にて見出している免疫賦活化作用をもつ乳酸菌由来 CpG DNA モチーフの取り込み解析から、*E.coli* 由来 DNA モチーフと同様に乳酸菌由来 DNA モチーフも取り込まれたことから、TLR9 を介してその機能性が発揮されるものと考えられた。また、CpG 配列を持たず、免疫刺激機能が無い nonCpG DNA モチーフ(CpG 2041)が、強い免疫刺激機能

を持つ CpG DNA モチーフ(CpG 2006)と同程度取り込まれ、TLR9 のリガン
ドが CpG DNA であるという従来の見解に疑問が持たれた。さらに、これらの
事実は、TLR9 を介する活性化シグナルの発動の有無が細胞内においてリガン
ドによって振り分けられている可能性を示すものである。今後、ブタを実験動
物としたヒトへのモデル系の計画的解析を通して、TLR9 のトランスフェクタ
ントを用いた機能性乳酸菌 DNA の認識性とシグナルトランスダクションの解
析を進めることにより、機能性食品開発の基礎研究が分子間の反応としてより
発展的に展開される。

これまで TLR9 の強発現細胞として知られる、樹状細胞にはサブセットが存
在し、マウスおよびヒトにおいてそれぞれ 6 つと 2 つの異なるサブセットが
同定されている[47-49]。マウスの異なる 6 つサブセットでは、2 つのサブ
セットに関しては明らかになっていないが、残りの 4 つのサブセットにおいて
TLR9 が発現していることがこれまでの mRNA レベルでの解析によって明ら
かになっている。また、ヒトの異なる 2 つのサブセットでは Plasmacytoid
DC(PDC)にのみ発現しており、myeloid DC(MDC)には発現していないことが
mRNA レベルでの解析によって明らかにされている[50]。本研究において成
熟ブタ FAE 直下の基底膜周辺領域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められ
た。よって、M 細胞の上皮細胞間ポケットに入り込んだ B 細胞、マクロファ
ージおよび IDC などが TLR9 を発現している可能性が示唆されると同時に、
基底膜にへばりつくようにして存在する筋繊維芽細胞が TLR9 を発現している
可能性も考えられた。さらにドーム上皮側のリンパ濾胞間域にも TLR9 を発現
した細胞が数多く認められ、この領域は T 細胞や樹状細胞が数多く存在して
いるといわれる傍濾胞域に相当し、TLR9 陽性細胞が形態学的に樹状細胞様の
形態をしていることから、M 細胞などから取り込まれた乳業用乳酸菌を含む
微生物由来の非メチル化 CpG DNA モチーフが、TLR9 を発現した樹状細胞を

活性化させて免疫賦活化作用をもたらしていることが強く示唆される。一方、濾胞域内には TLR9 を発現した細胞が認められなかったことから、B 細胞および FDC はタンパク質レベルでの TLR9 の発現が弱いことが示唆された。また、回腸由来パイエル板同様、TLR9 mRNA レベルで強発現が認められた腸管膜リンパ節は、一次リンパ濾胞においては濾胞内に、二次リンパ濾胞においては濾胞内の胚中心周辺領域に樹状細胞様の形態をした TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。しかし、回腸由来パイエル板では濾胞域内に TLR9 陽性細胞は認められておらず、基本的なリンパ濾胞構造は同じでありながら、組織によってリンパ濾胞における TLR9 の発現に違いが見られるという興味深い結果が得られた。一方、初生仔ブタにおいては、成熟ブタに比べてタンパク質レベルでの TLR9 の発現が弱いことが見出された。CpG DNA モチーフの刺激によって、ヒトの未成熟単球が樹状細胞へと分化誘導されるという報告もあり[51]、外来物質や細菌などの刺激により、成長とともにパイエル板が形成されていく過程で、回腸に点在する自然免疫系の細胞が、分化誘導されながらパイエル板の胚中心(germinal center)へと集中していく可能性が示唆された。仮にヒトに近い種であるといわれるブタにおいても、異なる樹状細胞サブセット間で TLR9 の発現に違いがあるとすれば、このような組織間での発現の違いは、ブタの回腸由来パイエル板および腸管膜リンパ節間で樹状細胞のサブセットが異なることによるのかもしれない。TLR9 により認識される細菌由来 CpG DNA は TLR9 を介して自然免疫におけるマクロファージや樹状細胞などの Th-1 系免疫を活性化させる炎症性サイトカイン、インターフェロン(IFN)、TNF- α 、IL-6、IL-12、IL-18 などの生産を促すことが知られている。それらサイトカインが myeloid DC を成熟させ、NK 細胞を活性化させ Th-1 免疫反応を増強しすると考えられている。この作用などより CpG DNA はマウスモデルにおいて、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫などに抵抗作用を持ち、また、抗腫瘍作用もあり、

ヒトにおいて悪性リンパ腫などですでに臨床応用が開始されたことも報告されている。さらに 2002 年には米国 Coley Pharmaceuticals Group 社とドイツ Ludwig-Maximilians 大学神経病理学研究所、およびドイツ Munich 工科大学の共同研究チームは、スクレイピーを感染させたマウスに CpG オリゴデオキシヌクレオチド分子を繰り返し注射することによりプリオン病の発症を抑えることに成功したと発表している[146]。

また本研究では DNA モチーフの評価系として利用可能な、動物細胞を用いたブタ TLR9 を強制発現させたトランスフェクタントの作製に成功した。本トランスフェクタントを用いた病原細菌(*E.coli*)および当研究室にて見出している免疫賦活化作用をもつ乳酸菌由来 CpG DNA モチーフの取り込み解析から、*E.coli* 由来 DNA モチーフと同様に乳酸菌由来 DNA モチーフも取り込まれたことから、TLR9 を介してその機能性が発揮されるものと考えられた。また、CpG 配列を持たず、免疫刺激機能が無い nonCpG DNA モチーフ(CpG 2041)が、強い免疫刺激機能を持つ CpG DNA モチーフ(CpG 2006)と同程度取り込まれ、TLR9 のリガンドが CpG DNA であるという従来の見解に疑問が持たれた。さらに、これらの事実は、TLR9 を介する活性化シグナルの発動の有無が細胞内においてリガンドによって振り分けられている可能性を示すものである。今後、ブタを実験動物としたヒトへのモデル系の計画的解析を通して、TLR9 のトランスフェクタントを用いた機能性乳酸菌 DNA の認識性とシグナルトランスダクションの解析を進めることにより、機能性食品開発の基礎研究が分子間の反応としてより発展的に展開される。

本研究の成果は、微生物由来 DNA モチーフによる刺激と TLR9 による認識およびシグナル伝達システムを応用した DNA ワクチンの開発にもつながるものである。感染を抑制するだけの低い免疫応答から、細菌を殺す有効性の高い応答へと切り換えることができれば、結核などの感染症の治療、さらには癌、

アレルギーなどへの幅広い可能性が期待できる。最近、腸管まで届く生きた抗原運搬役として乳酸菌が注目を浴びているが[147,148]、それに加えて乳酸菌由来 DNA もまた免疫賦活化能があることが当研究室の研究により明らかになったことから乳酸菌に対する期待が大いに高まっている。今回、TLR9 がパイエル板および腸管膜リンパ節で強い発現が認められたことは、TLR9 が腸管免疫系において重要な役割を担っていることを強く示唆するものであり、食餌性の乳業用乳酸菌の DNA が TLR9 を刺激し、免疫を活性化する可能性が考えられる。一方で、腸管の常在乳酸菌の DNA に対する免疫応答の巧妙な調節も存在することが考えられる。それゆえ、乳酸菌 DNA の TLR9 を介する腸管免疫系を明らかにすることは、腸管常在乳酸菌や乳業用乳酸菌を用いた DNA ワクチンの開発に必要不可欠である。本研究で得られた知見は、今後腸管における TLR9 を介するシグナル伝達経路について、その認識メカニズムを分子レベルで明らかにするための糸口となり、自然免疫という基本的な免疫システムがより発展的に解明されるための原動力ともなると確信する。さらに、プロバイオティック乳酸菌を含む食品を「生体防御食品」(Bio-defense foods) と位置付ける基礎として大いに期待できる。

4) まとめ

近年、樹状細胞など自然免疫系の細胞に、Toll-like receptor (TLR)とよばれる一群の受容体が存在していることが発見された。現在までに 10 種類の TLR の存在が報告されており、細菌やウイルスに含まれる特異的な分子パターン (pathogen associated molecular patterns : PAMPs) を認識し、その後の獲得免疫応答をリードする指令塔の役割を果たしているものと考えられている [12-14]。当研究室では、この TLR ファミリーのうち、微生物由来の DNA モチーフを認識する TLR9 に着目し、乳業用乳酸菌由来の DNA モチーフが TLR9 を介する免疫賦活化作用をもたらす可能性を検証している。

本研究では、ブタ腸管パイエル板より精製した poly(A)+mRNA を用いてブタ TLR9 のクローニングおよび全構造遺伝子配列を決定し、real-timePCR 法、ウェスタンブロット法によりブタ腸管臓器のなかでもパイエル版と腸管膜リンパ節において TLR9 の強発現を見いだした。抗ブタ TLR9 ポリクローナル抗体を作製し、それを用いた組織免疫染色およびフローサイトメトリー解析から、パイエル板では FAE 直下の基底膜周辺領域に TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。また、ドーム上皮側のリンパ濾胞間域にも TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。一方、腸管膜リンパ節では、一次リンパ濾胞においては濾胞内に、二次リンパ濾胞においては濾胞内の胚中心周辺領域に樹状細胞様の形態をした TLR9 を発現した細胞が数多く認められた。フローサイトメトリー解析の結果、成熟ブタの脾臓においては TLR9 を弱発現している細胞集団が認められた。成熟ブタの回腸由来パイエル板、腸間膜リンパ節、十二指腸、空腸および回腸では、R1 の細胞集団において、TLR9 を発現していることが認められた。また、腸管膜リンパ節を除く全ての組織において認められた R3 の細胞集団において、TLR9 を発現していることが認められた。我々が発見した乳

酸菌由来の免疫賦活化機能をもつ機能性 DNA モチーフに対する評価系を構築する目的から、ブタ TLR9 遺伝子を動物細胞に導入し、強制発現させたブタ TLR9 のトランスフェクダントを作製した。 *E.coli* および乳酸菌由来 DNA モチーフの取り込み解析から、トランスフェクダントにおけるブタ TLR9 を介する DNA モチーフの取り込みが認められた。 また、nonCpG2041 の取り込み解析より、TLR9 が CpG DNA のみをリガンドとする受容体ではない可能性が示唆され、取り込み強度と活性の強度は必ずしも比例しないことが考えられた。

特に食品と関わりの深い腸管免疫系の組織である回腸由来パイエル板および腸管膜リンパ節において、タンパク質レベルでの TLR9 の発現が認められたことは、乳業用乳酸菌由来の CpG DNA モチーフが生体内で TLR9 を介する免疫賦活化作用を誘導していることを強く示唆するものであり、これらの反応を応用した「生体防御食品(Bio-defense foods)」の開発に大いに期待がもたれた。

謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 B(2), No.13556018）により遂行することができた。

本研究を遂行するにあたりご助力いただいた，東北大学大学院農学研究科 動物資源化学研究室 西村順子技官ならびに院生諸氏（下里剛士 氏，加藤真一郎 氏，遠野雅徳 氏）および機能形態学研究室 山口高弘教授，麻生 久助教授ならびに渡辺康一博士に深く感謝する。

5) 参考論文

- [1] Charles A. J. Jr, Paul T, Mark W, Mark J. S, Part 1: An introduction to immunobiology and innate immunity. (Principles of innate and adaptive immunity). *Immuno biology* 5. 13-23, 2002.
- [2] Dixon MS. Jones DA. Keddie JS. Thomas CM. Harrison K. Jones JD. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*. 84(3):451-59, 1996 Feb 9.
- [3] Jones DA. Thomas CM. Hammond-Kosack KE. Balint-Kurti PJ. Jones JD. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. 266(5186):789-93, 1994 Nov 4.
- [4] Brading PA. Hammond-Kosack KE. Parr A. Jones JD. Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*. 23(3):305-38, 2000 Aug.
- [5] Lemaitre B. Nicolas E. Michaut L. Reichhart JM. Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86(6): 973-83, 1996 Sep 20.
- [6] Charles A. J. Jr, Paul T, Mark W, Mark J. S, Innate immunity. *Immuno biology* 5;35-91, 2002.
- [7] Charles A. J. Jr, Paul T, Mark W, Mark J. S, The adaptive immune response. *Immuno biology* 5. 295-380, 2002.
- [8] Hashimoto C. Hudson KL. Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 52(2):269-79, 1988 Jan 29.
- [9] Rock FL. Hardiman G. Timans JC. Kastelein RA. Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(2):588-93, 1998 Jan 20.
- [10] Sebastiani G. Leveque G. Lariviere L. Laroche L. Skamene E. Gros P. Malo D. Cloning and characterization of the murine toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in *Salmonella*-susceptible MOLF/Ei mice. *Genomics*. 64(3):230-40, 2000 Mar 15.

- [11] Takeuchi O. Kawai T. Sanjo H. Copeland NG. Gilbert DJ. Jenkins NA. Takeda K. Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*. 231(1-2):59-65, 1999 Apr 29.
- [12] Du X. Poltorak A. Wei Y. Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 11 (3): 362-71, 2000.
- [13] Chuang T.H. Ulevitch R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.* 11 (3): 372-8, 2000.
- [14] Chuang T. Ulevitch R.J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1518(1-2):157-161, 2001 Mar 19.
- [15] Aliprantis AO. Yang RB. Mark MR. Suggett S. Devaux B. Radolf JD. Klimpel GR. Godowski P. Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. 285(5428):736-9, 1999 Jul 30.
- [16] Schwandner R. Dziarski R. Wesche H. Rothe M. Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274(25):17406-9, 1999 Jun 18.
- [17] Ozinsky A. Underhill DM. Fontenot JD. Hajjar AM. Smith KD. Wilson CB. Schroeder L. Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(25):13766-71, 2000 Dec 5.
- [18] Alexopoulou L. Holt AC. Medzhitov R. Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413(6857):732-8, 2001 Oct 18.
- [19] Hoshino K. Takeuchi O. Kawai T. Sanjo H. Ogawa T. Takeda Y. Takeda K. Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162(7):3749-52, 1999 Apr 1.
- [20] Chow JC. Young DW. Golenbock DT. Christ WJ. Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274(16):10689-92, 1999 Apr 16.
- [21] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM,

Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410(6832):1099-103, 2001 Apr 26.

[22] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*..3(2):196-200, 2002 Feb.

[23] Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195(11):1507-12, 2002 Jun 3.

[24] Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*.. 13(7):933-40, 2001 Jul.

[25] Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* 166(1):15-9, 2001 Jan 1.

[26] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408(6813):740-5, 2000 Dec 7.

[27] Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends in Immunology*. 22(2):78-83, 2001 Feb.

[28] Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, Kaisho T, Akira S, Reis E Sousa C. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J. Immunol*.. 169(7):3652-60, 2002 Oct 1.

[29] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11(1):115-22, 1999 Jul.

[30] Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J. Immunol*. 164(8):4301-6, 2000 Apr 15.

- [31] Levashina EA. Langley E. Green C. Gubb D. Ashburner M. Hoffmann JA. Reichhart JM. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*. 285(5435):1917-9, 1999 Sep 17.
- [32] Shimazu R. Akashi S. Ogata H. Nagai Y. Fukudome K. Miyake K. Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189(11):1777-82, 1999 Jun 7.
- [33] Akashi S. Ogata H. Kirikae F. Kirikae T. Kawasaki K. Nishijima M. Shimazu R. Nagai Y. Fukudome K. Kimoto M. Miyake K. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 268(1):172-7, 2000 Feb 5.
- [34] John B. Rajagopal D. Pashine A. Rath S. George A. Bal V. Role of IL-12-independent and IL-12-dependent pathways in regulating generation of the IFN-gamma component of T cell responses to *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* 169(5):2545-52, 2002 Sep 1.
- [36] Weiner GJ. CpG DNA in cancer immunotherapy. *Cur. Top. Microbio. Immunol.* 247:157-70, 2000.
- [37] Askenase PW. Gee whiz: CpG DNA allergy therapy! *J. Allergy. Clinical. Immunol.* 106(1 Pt 1):37-40, 2000 Jul.
- [37] Freidag BL. Melton GB. Collins F. Klinman DM. Cheever A. Stobie L. Suen W. Seder RA. CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice challenged with *M. tuberculosis*. *Infection & Immunity*. 68(5):2948-53, 2000 May.
- [38] Juffermans NP. Leemans JC. Florquin S. Verbon A. Kolk AH. Speelman P. van Deventer SJ. van der Poll T. CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infection & Immunity*. 70(1):147-52, 2002 Jan.
- [39] Kitazawa H, Nomura M, Itoh T, Yamaguchi T. Functional alteration of macrophages by a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy. Sci.* 74(7):2082-8, 1991 Jul.
- [40] Kitazawa H, Matsumura K, Itoh T, Yamaguchi T. Interferon induction in murine peritoneal

macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Immunol.* 36(3):311-5, 1992.

[41] Kitazawa H, Yamaguchi T, Itoh T. B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy. Sci.* 75(11):2946-51, 1992 Nov.

[42] Kitazawa H, Yamaguchi T, Miura M, Saito T, Itoh T. B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, viili. *J. Dairy. Sci.* 76(6):1514-9, 1993 Jun.

[43] Kitazawa H, Tomioka Y, Matsumura K, Aso H, Mizugaki M, Itoh T, Yamaguchi T. Expression of mRNA encoding IFN alpha in macrophages stimulated with *Lactobacillus gasseri*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 120(3):315-21, 1994 Jul 15.

[44] Kitazawa H, Itoh T, Tomioka Y, Mizugaki M, Yamaguchi T. Induction of IFN-gamma and IL-1 alpha production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Int. J. Food Microbiol.* 31(1-3):99-106, 1996 Aug.

[45] Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* 40(3):169-75, 1998 Apr 14.

[46] Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int. J. Food Microbiol.* 65(3):149-62, 2001 May 10.

[47] Kitazawa H, Ino T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. A novel immunostimulating aspect of *Lactobacillus gasseri*: induction of "Gasserokine" as chemoattractants for macrophages. *Int. J. Food Microbiol.* 77(1-2):29-38, 2002 Jul 25.

[48] Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; in press.

[49] Baarsh M. Inflammatory cytokine expression in acute porcine pleuropneumonia. *Thesis*.

Department of Veterinary Pathobiology, University of Minnesota, MN 1994.

[50] Zamboni L, DeMartino C. Buffered picric acid formaldehyde : A new rapid fixation for electron microscopy. *J Cell Biol.* 35,148A. 1967.

[51] Izumi S, Moriuchi T, Koji T. Localization of c-myc in HL-60 cells, neoplastic and normal tissues : An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Acta Histochem Cytochem.* 21:327-342. 1988.

[52] 渡辺慶一, 中根一穂, 酵素抗体法 学際企画 p42.

[53] Swinbanks D. O'Brien J. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature.* 364(6434):180, 1993 Jul 15.

[54] Isolauri E. Rautava S. Kalliomaki M. Kirjavainen P. Salminen S. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Cur. Opin. Allergy. Clinical Immunol.* 2(3):263-71, 2002 Jun.

[55] Cummings JH. Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *British J. Nutrition.* 87 Suppl 2:S145-51, 2002 May.

[56] Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Cur. Opin. Clinical Nutrition. Metabolic Care.* 4(6):571-9, 2001 Nov.

[57] Collins MD. Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American J. Clinical Nutrition.* 69(5):1052S-1057S, 1999 May.

[58] 光岡知足「機能性食品-プロバイオティクス, プレバイオティクス, バイオジェニクス. 腸内フローラシンポジウム 5, 腸内フローラとプロバイオティクス(光岡知足 編) 1998; 1-16. 学会出版センター.

[59] 伊藤敏敏, 渡邊乾二, 伊藤良 編「発酵乳, 乳酸菌の生理的效果」動物資源利用学 1998; 140-142.

[60] Rafter J. Probiotics as dietary supplements can have a cancer-preventive effect. But the epidemiological studies are contradictory. *Lakartidningen.* 98(50):5732-4, 2001 Dec 12.

[61] Wollowski I. Rechkemmer G. Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American J. Clinical Nutrition.* 73(2 Suppl):451S-455S, 2001 Feb.

- [62] Koga Y. Probiotics for *H. pylori* infection. *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 60 Suppl 2:756-61, 2002 Feb.
- [63] Solauri E. Kirjavainen PV. Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut*. 50 Suppl 3:III54-9, 2002 May.
- [64] Torrens JK. McWhinney PH. Probiotics and life-threatening infection. *J. Infection*. 39(3):246, 1999 Nov.
- [65] Prantera C. Scribano ML. Falasco G. Andreoli A. Luzzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut*. 51(3):405-9, 2002 Sep.
- [66] Goldin B. The evidence for the effectiveness of probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Nutrition in Clinical Care*. 5(1):1-2, 2002 Jan-Feb.
- [67] Isolauri E. Kirjavainen PV. Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut*. 50 Suppl 3:III54-9, 2002 May.
- [68] Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Canadian J. Gastroenterology*. 15(12):817-22, 2001 Dec.
- [69] Krieg AM. Yi AK. Matson S. Waldschmidt TJ. Bishop GA. Teasdale R. Koretzky GA. Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374(6522):546-9, 1995 Apr 6.
- [70] Shirota H. Sano K. Hirasawa N. Terui T. Ohuchi K. Hattori T. Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol*. 169(2):787-94, 2002 Jul 15.
- [71] Stunz LL. Lenert P. Peckham D. Yi AK. Haxhinasto S. Chang M. Krieg AM. Ashman RF. Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur. J. Immunol*. 32(5):1212-22, 2002 May.
- [72] Lenert P. Stunz L. Yi AK. Krieg AM. Ashman RF. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense. Nucleic Acid Drug Development*. 11(4):247-56, 2001 Aug.

- [73] Decker T. Peschel C. Effect of immunostimulatory CpG-oligonucleotides in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia. Lymphoma*. 42(3):301-7, 2001 Jul.
- [74] Britigan BE. Lewis TS. Waldschmidt M. McCormick ML. Krieg AM. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *J. Immunol*. 167(5):2921-8, 2001 Sep 1.
- [75] Hartmann G. Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol*. 164(2):944-53, 2000 Jan 15.
- [76] Krieg AM. Yi AK. Rescue of B cells from apoptosis by immune stimulatory CpG DNA. *Springer Seminars. Immunopathol*. 22(1-2):55-61, 2000.
- [77] Decker T. Schneller F. Sparwasser T. Tretter T. Lipford GB. Wagner H. Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 95(3):999-1006, 2000 Feb 1. 10648415
- [78] Hartmann G. Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol*. 164(2):944-53, 2000 Jan 15.
- [79] Yi AK. Peckham DW. Ashman RF. Krieg AM. CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int. Immunol*. 11(12):2015-24, 1999 Dec.
- [80] Chelvarajan RL. Raithatha R. Venkataraman C. Kaul R. Han SS. Robertson DA. Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur. J. Immunol*. 29(9):2808-18, 1999 Sep.
- [81] Goeckeritz BE. Flora M. Witherspoon K. Vos Q. Lees A. Dennis GJ. Pisetsky DS. Klinman DM. Snapper CM. Mond JJ. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *Int Immunol*. 11(10):1693-700, 1999 Oct.
- [82] Brown WC. Estes DM. Chantler SE. Kegerreis KA. Suarez CE. DNA and a CpG oligonucleotide

derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. *Infection & Immunity*. 66(11):5423-32, 1998 Nov.

[83] Yi AK. Chang M. Peckham DW. Krieg AM. Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J.Immunol*. 160(12):5898-906, 1998 Jun 15.

[84] Yamamoto S. Yamamoto T. Nojima Y. Umemori K. Phalen S. McMurray DN. Kuramoto E. Iho S. Takauji R. Sato Y. Yamada T. Ohara N. Matsumoto S. Goto Y. Matsuo K. Tokunaga T. Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Japanese J. Infectious Diseases*. 2002 Apr; 55(2):37-44.

[85] Sandrine Henri, David Vremec, Arun Kamath, Jason Waithman, Stuart Williams, Christophe Benoist, Kim Burnham, Sem Saeland, Emanuela Handman, and Ken Shortman. The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *J Immunol*. 167: 741-748. 2001.

[86] Akiko Iwasaki and Brian L. Kelsall. Unique Functions of CD11b+, CD8+, and Double-Negative Peyer's Patch Dendritic Cells. *J Immunol*. 166: 4884-4890. 2001.

[87] Ken Shortman, Yong-Jun Liu. MOUSE AND HUMAN DENDRITIC CELL SUBTYPES. *Nature Reviews Immunology*. 2, 151 – 161. 2002 Mar 1.

[88] Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol*. 3(8):699-702. 2002 Aug.

[89] Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 166(1):249-55. 2001 Jan 1.

[90] Carlson GA. Postexposure prophylaxis against transmissible spongiform encephalopathies: CpG oligodeoxynucleotides in mice. *Lancet*. 360(9328):184, 2002 Jul 20.

[91] Dietrich G. Kolb-Maurer A. Spreng S. Scharl M. Goebel W. Gentschev I. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine*. 19(17-19):2506-12, 2001 Mar 21.

[92] Plant L. Conway P. Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's patches in mice. *Clinical*.

【4】研 究 成 果 公 表 論 文 等

1) 学 会 誌 等

2) 学 会 発 表・招 待 講 演

3) 総 説

4) 記 事

5) 特 許

1) 学 会 誌 等

1. 北澤春樹, 齋藤忠夫; 「乳酸菌からの免疫活性 DNA モチーフの発見と“生体防御食品”への応用。」ミニレビュー. わが国における乳酸菌のフロンティア研究. 日本農芸化学会誌, 76, 833-836 (2002).
2. Takeshi Shimosato, **Haruki Kitazawa**, Shinichiro Katoh, Yoshihisa Tomioka, Risuke Karima, Satoshi Ueha, Yasushi Kawai, Takanori Hishinuma, Kouji Matsushima and Tadao Saito; Swine Toll-like receptor 9 recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1627, 56-61 (2003).
3. **Haruki Kitazawa**, Hiroshi Watanabe, Takeshi Shimosato, Yasushi Kawai, Takatoshi Itoh and Tadao Saito; Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 11-21 (2003).
4. Takeshi Shimosato, **Haruki Kitazawa**, Masanori Tohno, Shinichiro Katoh, Yasushi Kawai, Tadao Saito; Development of immune assay system for both CpG and non-CpG DNA from lactic acid bacteria using a transfectant of swine Toll-like receptor 9. *Animal Science Journal*. in press.
5. Takeshi Shimosato, Masanori Tohno, Shinichiro Katoh, Kouichi Watanabe, Yasushi Kawai, Hisashi Aso, Takahiro Yamaguchi, Tadao Saito and **Haruki Kitazawa**; Toll-like receptor 9 expresses on M cells of follicle-associated epithelia in swine Peyer's patches. *Cell&Tissue Research.*, submitted
6. Shinichiro Katoh, Takeshi Shimosato, Masanori Tohno, Yasushi Kawai Tadao Saito and **Haruki Kitazawa**; Cloning and characterization of swine Interleukin-17 preferentially expressed in intestine. *J. Interferon Cytokine Res.*, submitted.

2) 学 会 発 表・招 待 講 演

[学会発表]

1.北澤春樹, 下里剛士, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

乳酸菌 DNA モチーフの腸管パイエル板細胞による取り込みとサイトカインネットワークの制御

日本畜産学会 第 100 回大会 講演要旨集, p.177, 2002.

2.下里剛士, 北澤春樹, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

ブタ Toll-like receptor 9 (sTLR9)の腸管パイエル板からのクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2002 年度大会 講演要旨集, p.280, 2002. (学会トピックスに採択)

3.北澤春樹, 加藤真一郎, 下里剛士, 川井 泰, 齋藤忠夫 ;

乳酸菌遺伝子データバンクを用いた CpG DNA モチーフの検索と同モチーフを含む合成オリゴ DNA の免疫活性

日本畜産学会 第 101 回大会 講演要旨集, p.163, 2003.

4.下里剛士、北澤春樹、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor (sTLR) 9 発現細胞系の構築とその利用

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.69, 2003.

5.北澤春樹、下里剛士、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor (sTLR) 9 による乳酸菌 DNA モチーフの認識性

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.69, 2003.

6.遠野雅徳、北澤春樹、下里剛士、加藤真一郎、川井 泰、渡邊康一、山口高弘、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(TLR)9 の抗体作製と臓器発現部位の解析

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.70, 2003.

7.加藤真一郎、北澤春樹、下里剛士、川井 泰、齋藤忠夫

乳酸菌 DNA モチーフによるブタ腸管におけるサイトカイン mRNA の発現誘導

日本畜産学会 第 102 回大会 講演要旨集, p.70, 2003.

8.下里剛士、北澤春樹、松本真由美、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(sTLR)2 のクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2003 年度大会 講演要旨集, p.11, 2003.

9.北澤春樹、下里剛士、松本真由美、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ Toll-like receptor(sTLR)2 に相互作用をもつ sTLR1 および 6 のクローニングとその発現解析

日本農芸化学会 2003 年度大会 講演要旨集, p11, 2003

10.下里剛士、北澤春樹、遠野雅徳、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ TLR9 トランスフェクタントによる乳酸菌 DNA の免疫評価系の構築

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004.

11.遠野雅徳、北澤春樹、下里剛士、加藤真一郎、川井 泰、齋藤忠夫

ブタ TLR2 トランスフェクタントの構築とその利用

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004

12.加藤真一郎、北澤春樹、下里剛士、遠野雅徳、川井 泰、齋藤忠夫

ブタインターロイキン-17(IL-17)のクローニングとその特徴

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004.

13.北澤春樹、加藤真一郎、下里剛士、遠野雅徳、川井 泰、齋藤忠夫

ブタインターフェロン- γ 受容体(IFN γ R)のクローニングとその解析

日本畜産学会 第 103 回大会 講演要旨集, p., 2004.

3) 総 説

北澤春樹, 齋藤忠夫

「乳酸菌からの免疫活性 DNA モチーフの発見とブタ Toll 様受容体トランスフェクタントによる活性評価系の構築」特集 プロバイオティクスの機能と広がる応用範囲, 食品工業, 46(14), 25-31 (2003).

4) 記 事

「東北大、ブタの TLR 単離, ヒトモデルとしての免疫活性化因子スクリーニングに活用」基礎科学・技術・シーズ, 日経バイオテク(2003 年 4 月 14 日発行), p.28, 2003.

5) 特 許

1. Toll 様レセプター強制発現細胞の利用 特許出願中 (特願 2003-172132)

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。